

PCT/JP03/11118

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

29.08.03

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application: 2002年 9月27日

出 願 番 号

Application Number: PCT/JP02/10018

出 願 人

Applicant (s): 株式会社 ビー・エム・エル

近藤 直美

松井 永子

金子 英雄

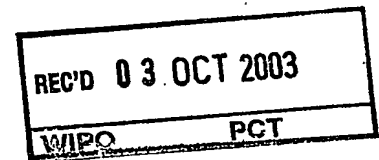
青木 美奈子

長尾 みづほ

笠原 貴美子

服部 浩明

江頭 徹

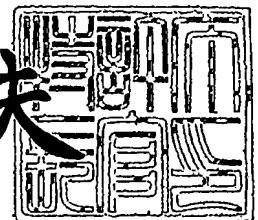


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003 年 9 月 19 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康夫



出証平 15-500265

受理官庁用写し

1/9

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年09月26日（26. 09. 2002）木曜日 22時53分38秒

PBM78/PCT

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	PCT/JP02/10018
0-2	国際出願日	27.09.02
0-3	(受付印)	PCT International Application 日 本 国 特 許 庁
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	PBM78/PCT
I	発明の名称	アレルギー素因を規定する遺伝子の検出方法
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	株式会社 ビー・エム・エル
II-4en	Name	BML, INC.
II-5ja	あて名:	151-0051 日本国 東京都 渋谷区 千駄ヶ谷5丁目21番3号
II-5en	Address:	21-3, Sendagaya 5-chome Shibuya-ku, Tokyo 151-0051 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	03-3350-0111
II-9	ファクシミリ番号	03-3350-1180
III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	すべての指定国 (all designated States)
III-1-4ja	氏名 (姓名)	近藤 直実
III-1-4en	Name (LAST, First)	KONDO, Naomi
III-1-5ja	あて名:	467-0821 日本国 愛知県 名古屋市瑞穂区 上坂町1-3-1
III-1-5en	Address:	3-1, Kamisakacho 1-chome Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi 467-0821 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2 III-2-4j a III-2-4e n III-2-5j a	右の指定国についての出願人である。 氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:	松井 永子 MATSUI, Eiko 502-0932 日本国 岐阜県 岐阜市 則武中2-15-16 The TOM 305 Room 305, The TOM, 15-16, Noritakenaka 2-chome Gifu-shi, Gifu 502-0932 Japan
III-2-5e n	Address:	
III-2-6 III-2-7	国籍 (国名) 住所 (国名)	日本国 JP 日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-2 III-3-4j a III-3-4e n III-3-5j a	右の指定国についての出願人である。 氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:	金子 英雄 KANEKO, Hideo 501-0435 日本国 岐阜県 本巣郡北方町 春来町3-103 3-103, Harukimachi Kitagata-cho, Motosu-gun, Gifu 501-0435 Japan
III-3-5e n	Address:	
III-3-6 III-3-7	国籍 (国名) 住所 (国名)	日本国 JP 日本国 JP
III-4 III-4-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-4-2 III-4-4j a III-4-4e n III-4-5j a	右の指定国についての出願人である。 氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:	青木 美奈子 AOKI, Minako 500-8041 日本国 岐阜県 岐阜市鞆屋町 15-1 U-Houseギフ8C Room 8C, U-House Gifu, 15-1, Utsuboya-cho Gifu-shi, Gifu 500-8041 Japan
III-4-5e n	Address:	
III-4-6 III-4-7	国籍 (国名) 住所 (国名)	日本国 JP 日本国 JP

III-5 III-5-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-5-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-5-4j a	氏名(姓名)	長尾 みづほ
III-5-4e n	Name (LAST, First)	NAGAO, Mizuho
III-5-5j a	あて名:	500-8801 日本国 岐阜県 岐阜市 忠節町4-71-1 コスモ河村202
III-5-5e n	Address:	Room 202, Kosumokawamura, 71-1, Chusetsu-cho 4-chome Gifu-shi, Gifu 500-8801 Japan
III-5-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-5-7	住所(国名)	日本国 JP
III-6 III-6-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-6-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-6-4j a	氏名(姓名)	笠原 貴美子
III-6-4e n	Name (LAST, First)	KASAHARA, Kimiko
III-6-5j a	あて名:	501-6241 日本国 岐阜県 羽島市竹鼻町 昭和町3045
III-6-5e n	Address:	3045, Showamachi Takehana-cho, Hashima-shi, Gifu 501-6241 Japan
III-6-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-6-7	住所(国名)	日本国 JP
III-7 III-7-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-7-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-7-4j a	氏名(姓名)	服部 浩明
III-7-4e n	Name (LAST, First)	HATTORI, Hiroaki
III-7-5j a	あて名:	350-1101 日本国 埼玉県 川越市 的場1361番地1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内
III-7-5e n	Address:	c/o General Laboratory, BML, INC. 1361-1, Matoba Kawagoe-shi, Saitama 350-1101 Japan
III-7-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-7-7	住所(国名)	日本国 JP

III-8	その他の出願人又は発明者	
III-8-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-8-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-8-4j a	氏名 (姓名)	江頭 徹
III-8-4e n	Name (LAST, First)	EGASHIRA, Toru
III-8-5j a	あて名:	350-1101 日本国 埼玉県 川越市 的場1361番地 1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内
III-8-5e n	Address:	c/o General Laboratory, BML, INC. 1361-1, Matoba Kawagoe-shi, Saitama 350-1101 Japan
III-8-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-8-7	住所 (国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名 (姓名)	志村 光春
IV-1-1en	Name (LAST, First)	SHIMURA, Mitsuharu
IV-1-2ja	あて名:	150-0031 日本国 東京都 渋谷区 桜丘町 9-3
IV-1-2en	Address:	9-3, Sakuragaoka-cho Shibuya-ku, Tokyo 150-0031 Japan
IV-1-3	電話番号	03-5456-8750
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3770-5650
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE SK TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW

特許協力条約に基づく国際出願願書

PBM78/PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2002年09月26日（26. 09. 2002）木曜日 22時53分38秒

V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	出願日	2002年08月30日 (30. 08. 2002)
VI-1-2	出願番号	特願2002-252446
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)
VIII	申立て	申立て数
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-
VIII-4	発明者である旨の申立て (米国を指定国とする場合)	-
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	2

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4. 17(v)及び51の2. 1(a)(v)）	本国際出願に関し、 株式会社 ビー・エム・エルは、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i) VIII-5-1 (ii) VIII-5-1 (iii) VIII-5-1 (iv) VIII-5-1 (v)	開示の種類 開示の日付： 開示の名称： 開示の場所：	刊行物 THE JOURNAL OF Allergy AND Clinical Immunology VOLUME 109 No. 4 APRIL 2002 pp. 669-675
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。：	すべての指定国

VIII-5-2	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 近藤 直実は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のよう に開示されたことを申し立てる。
VIII-5-2 (i)	開示の種類	刊行物 THE JOURNAL OF Allergy AND Clinical Immunology VOLUME 109 No. 4 APRIL 2002 pp. 669-675
VIII-5-2 (ii)	開示の日付：	
VIII-5-2 (iii)	開示の名称：	
VIII-5-2 (iv)	開示の場所：	
VIII-5-2 (v)	本申立ては、次の指定国のため になされたものである。：	
		すべての指定国

特許協力条約に基づく国際出願願書

PBM78/PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2002年09月26日（26.09.2002）木曜日 22時53分38秒

IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書（申立てを含む）	9	-
IX-2	明細書（配列表を除く）	21	-
IX-3	請求の範囲	4	-
IX-4	要約	1	EZABST00. TXT
IX-5	図面	13	-
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数 （明細書の配列表を除く）	48	
IX-6	明細書の配列表	23	-
IX-7	合計	71	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-11	包括委任状の写し	✓	-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表		
IX-16 - (i)	規則13の3に基づき提出する 国際調査のための写し（国際 出願の一部を構成しない）	-	1 フレキシブルディスク
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
IX-18	その他	納付する手数料に相当する 特許印紙を貼付した書 面	-
IX-18	その他	国際事務局の口座への振 込を証明する書面	-
IX-18	その他	陳述書	-
IX-18	その他	FDの情報を記載した書 面	-
IX-19	要約書とともに提示する図の 番号		
IX-20	国際出願の使用言語名：	日本語	
X-1	提出者の記名押印		
X-1-1	氏名（姓名）	志村 光春	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書 類の実際の受理の日	27.09.02
10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書 類を補完する書類又は図面で あってその後期間内に提出さ れたものの実際の受理の日（ 訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基 づく必要な補完の期間内の受理 の日	
10-5	出願人により特定された国際 調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国 際調査機関に調査用写しを送 付していない	

特許協力条約に基づく国際出願願書

PBM78/PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2002年09月26日（26. 09. 2002）木曜日 22時53分38秒

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

明細書

アレルギー素因を規定する遺伝子の検出方法

技術分野

本発明は、ヒトの遺伝子変異の検出方法に関し、より具体的には、ヒトのアレルギー素因を検出するための指標となり得る遺伝子変異の検出方法に関する発明である。

背景技術

アレルギーは、アレルゲンの侵入により応答して生ずる、生体にとっては不利益な免疫反応の総称であり、その機序の違いにより、I型からV型までの、大きく5つに分類される。また、アトピー（異型の疾患の意味）とは、抗原と抗体による免疫反応のうち、IgE抗体が関与するI型の反応を示す遺伝的な素質を意味する用語である。そして、このアトピーがかかわって発症する疾患が、アトピー性疾患である。アレルギー疾患の多くは、このアトピー性疾患であることが知られている。かかるアレルギー（アトピー）性疾患は、遺伝的な素因と、環境要因（アレルゲンの存在）によって発症するといわれている。

このように、アレルギー（アトピー）性疾患の発症要素として、アレルゲンは最も本質的なものであり、例えば、アトピー性喘息のアレルゲンは、ハウスダスト、ダニ、カンジダ等である場合が多く、アレルギー性鼻炎では、スギやブタクサの花粉である場合が多い。また、食物性アレルゲンとしては、鶏卵、ミルク、大豆等が挙げられる。

アレルギー（アトピー）性疾患の発症には、まず、生体に、アレルギー（アトピー）の素因が存在することが前提となり、その生体が、アレルゲンと接触することにより、様々な要因によって、アレルギー（アトピー）性疾患が発症する。例えば、上記のI型アレルギーは、即時型アレルギーとして知られており、アレルゲンが、生体内に侵入することにより、IgE抗体が産生される。このIgE抗体はFcεレセプターを介してマスト細胞や好塩基球上に結合する。ここにアレルゲンが結合することにより、2分子のIgE抗体が架橋し、その結果、細胞内顆粒に貯蔵さ

れているヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、アリルサルファターゼ、NCF

(neutrophil chmotactic factor)、ECP (eosinophil cationic protein) などが脱顆粒により放出される。さらに、アラキドン酸から新たに産生されるロイコトリエン B_4 、 C_4 、 D_4 、プロスタグランジン E_2 、 $F_2\alpha$ 、 I_2 、トロンボキサン A_2 や、血小板活性化因子(PAF)などの化学伝達物質が放出される。これら放出されたヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質は、好酸球、好中球、リンパ球、単球、マクロファージなどの炎症細胞を刺激し、平滑筋の収縮、血管透過性の亢進、粘液分泌亢進などを引き起こし、アレルギーが発症する。

このように、アレルギー（アトピー）性疾患の発症に際しては、まず、アレルギー（アトピー）の素因が必要であり、この素因を有する生体が、アレルゲンに感作されて免疫アレルギー反応が惹起され、さらに種々の要因が加わり、はじめてアレルギー（アトピー）性疾患が発症し、さらに増悪因子によっても影響されるものと考えられている。

上述したように、IgEはアレルギーを規定する、最も、基本的で、かつ、重要な蛋白質である。

本発明は、このIgEの産生に関連する遺伝子とアレルギー（アトピー）の素因とを関連づける要素を見い出して、これを利用した、アレルギー（アトピー）の素因の解析手段を提供することで、アレルギー（アトピー）性疾患の発症の予防や、アレルギー（アトピー）性疾患の治療に寄与する途を提供することにある。

発明の開示

IgE産生はT細胞（TH2）より分泌されるインターロイキン4（IL-4）等が、B細胞を刺激することにより起こる。このように、IgEの産生は、IL-4を中心とする情報伝達により誘導され、活性化される。

一方、このIL-4によるB細胞からのIgE産生は、T細胞（TH1）より分泌されるインターフェロン γ （INF- γ ）を中心とする情報伝達により制御され、INF- γ 産生は、その情報伝達の上流で、さらにインターロイキン12（IL-12）やインターロイキン18（IL-18）等の、サイトカインによるT細胞への刺激により、その産生が誘導される。

このように、アレルギー反応の主役であるIgEの産生は、IL-4による産生誘導と、

INF- γ による産生抑制とのバランスによってコントロールされており、このバランスが崩れることによって、IgEの産生のバランスも崩れることとなる。IgE産生促進系のシステムは、IL-4が、そのレセプターであるIL-4レセプター（IL-4R）に結合することによりIgE産生が促されるシステムであり、IgE産生抑制系のシステムは、IL-12 あるいはIL-18が、それぞれのレセプターであるIL-12レセプター（IL-12R）あるいはIL-18レセプター（IL-18R）に結合することによりINF- γ が分泌され、IgE産生が抑制されるシステムである。

本発明者らは、このIgEの産生システムに関連する遺伝子について着目することで、目的とするアレルギー（アトピー）の素因を遺伝子レベルで特定できるのではないかと考えた。

本発明者の一人は、アレルギー疾患においては、家族的、あるいは、遺伝的集積があると考えられていることから、患者のIgE産生量を測定し、その結果、両親のいずれかに血清IgE値が高値であるほど、発端者のIgEが高値である結果を得た（近藤直実、他、アトピー性皮膚炎とIL-12レセプター遺伝子変異、臨床免疫36:535-540, 2001）。また、患者末梢血単核球（PBMCs）を分離し、マイトゲンあるいは抗原刺激により産生される、培養上清中のINF- γ とIL-4量を測定したところ、IgE高値の患者においてIgE値と産生IL-4量は正相関を示すよりは、むしろ、INF- γ と負の相関を示すことが明らかになった（Teramoto T. et al., Clin Exp Allergy, 28:74-82, 1998）。さらに、卵に過敏性のある患者では、オプアルブミン刺激後の、培養上清中のIL-4 量と血清IgE値に、有意な（ $p<0.01$ ）正相関が認められ、INF- γ 量と血清IgE値 においては、有意な（ $p<0.05$ ）逆相関が認められた（Kuwabara N, et al., J Investig Allergol Clin Immunol 5:198-204, 1995）。また、IL-4とポークウィードマイトゲンで刺激した、PBMCsのIgE産生が、リコンビナントINF- γ により抑制される（Kuwabara N, et al., J Investig Allergol Clin Immunol 5:198-204, 1995）ことから、INF- γ が、IL-4により誘導されるIgE産生を抑制していることと、INF- γ の産生が低下していると、IgE産生が亢進することが示唆された。さらに、INF- γ のmRNAを定量したところ、INF- γ の産生量は、INF- γ のmRNA量と強い正相関（ $r=0.947$, $n=8$ ）を示すことから、上記INF- γ の産生低下は、INF- γ のmRNA発現低下によることが明らかになった（Teramoto T. et al., Clin Exp Allergy, 28:74-82, 1998）。

このような研究成果を基に、アレルギーのIgE産生過剰におけるINF- γ 産生不全と考えられる病態に関して、さらに情報伝達の上位でINF- γ の産生誘導するIL-12とIL-18について検討した。IL-12は、分子サイズ75kDで、35kD (p35) と40kD (p40) のサブユニットとからなるヘテロダイマーの蛋白質である。IL-12レセプター

(IL-12R) は、 β 1鎖と β 2鎖からなり、 β 2鎖は細胞内ドメインに3ヶ所のチロシン残基を有する。IL-12Rは、IL-12のシグナルカスケードの初発ステップである。患者由来PBMCsを、IL-12、あるいは、IL-18で刺激した際の培養上清中のINF- γ 産生量を測定した結果、両者それぞれの刺激で産生されるINF- γ 産生量は、正相関を示した。しかしながら、両者の刺激によるINF- γ 産生に乖離する症例が認められた。

このような結果は、PBMCsを、IL-12刺激、フィトヘマアグラチニン (PHA) 刺激した際のINF- γ 産生量にも同様に認められた。これらのINF- γ 産生量に乖離が認められた症例について、それぞれのレセプターを含む情報伝達系の異常を検索した。

このような結果に基づき、遺伝子解析を行った結果、アレルギー (アトピー) の素因に関連する、複数の遺伝子変異が認められた (後述する)。

これらの遺伝子変異は、IgEの産生バランスに深く関わっており、これらの遺伝子変異についての解析を行うことにより、被験者のアレルギー (アトピー) の素因を検出することが可能であることを、本発明者は見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、後述する1～9で示される遺伝子変異からなる群から選ばれる1～9種の遺伝子変異を検出することにより、被験者のアレルギー素因を検出する、遺伝子変異の検出方法 (以下、本遺伝子検出方法ともいう) を提供する発明である。

なお、本明細書におけるアミノ酸の表記方法は、三文字法及び一文字法による。念のために、かかる表記内容をここに記載する。

『アラニン [A l a (三文字法、以下同様)、A (一文字法、以下同様)]

バリン [V a l、V]、ロイシン [L e u、L]、イソロイシン [I l e、I]、プロリン [P r o、P]、フェニルアラニン [P h e、F]、トリプトファン [T r p、W]、メチオニン [M e t、M]、グリシン [G l y、G]、セリン [S e r S]、スレオニン [T h r、T]、システイン [C y s、C]、グルタミ

ン〔G l n、Q〕、アスパラギン〔A s n、N〕、チロシン〔T y r、Y〕、リジン〔L y s、K〕、アルギニン〔A r g、R〕、ヒスチジン〔H i s、H〕、アスパラギン酸〔A s p、D〕、グルタミン酸〔G l u、E〕』

また、本明細書中の表記で、例えば、「A 1 0 0 V」とは、「本来のアミノ酸配列における100番目のアラニンが、バリンに置換されている変異」を示すものとする。

また、後述する1～9で表される遺伝子変異を特定する基となる、野生型の遺伝子配列における配列表記は、特に断らない限り、全て、cDNAの塩基配列番号である。よって、1～9の遺伝子変異は、全て、少なくともcDNAにおいて認められる変異であるが、かかるcDNAの変異に対応するゲノムDNAにおける変異や、mRNAにおける変異、に基づくアレルギー素因の検出にかかわる遺伝子変異の検出方法も、本遺伝子変異検出方法の技術的範囲に包含されるものである。

図面の簡単な説明

第1図は、インベーター・アッセイ法のあらましを略図化した図面である。

第2図は、遺伝子変異1にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第3図は、遺伝子変異2にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第4図は、遺伝子変異3にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第5図は、遺伝子変異4にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第6図は、遺伝子変異1～4にかかわる被験者の、培養末梢血単核球が分泌したIgE量を示す図面である。

第7図は、遺伝子変異5にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第8図は、遺伝子変異6にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第 9 図は、遺伝子変異 7 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第 10 図は、遺伝子変異 8 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第 11 図は、遺伝子変異 8 にかかわる、培養末梢血単核球が分泌した IgE 量を示す図面である。

第 12 図は、遺伝子変異 9 にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第 13 図は、遺伝子変異 9 が認められる被験者の家系解析の結果を示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について説明する。

上述したように、本発明は、アレルギー（アトピー）の素因に関連する遺伝子である、インターロイキン 12 レセプター（IL-12R） β 2 鎖および β 1 鎖遺伝子と、インターロイキン 18 レセプター（IL-18R） α 鎖遺伝子と、インターフェロン γ レセプター（INF γ R）1 鎖遺伝子における遺伝子変異を検出することで、アレルギー（アトピー）の素因を検出する、遺伝子変異の検出方法である。

IL-12R β 2 鎖遺伝子と、これがコードする IL-12R β 2 鎖蛋白質については、すでに解析がなされている（Presky D, et al., Proc Natl Acad Sci, 93:14002-14007, 1996）。この IL-12R β 2 鎖遺伝子の cDNA の塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号 1 に示した（Gene Bank Accession Number:U64198）。IL-12R β 1 鎖遺伝子と、これがコードする IL-12R β 1 鎖蛋白質についても解析がなされている（Chua A, et al., J Immun, 153:128-136, 1994）。この IL-12R β 1 鎖遺伝子の cDNA の塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号 2 に示した（Gene Bank Accession Number:U03187）。また、INF γ R 1 鎖遺伝子と、これがコードする INF γ R 1 鎖蛋白質については、すでに解析がなされている（Aguet M, Cell, 55:273-280, 1988）。この INF γ R 1 鎖遺伝子の cDNA の塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号 3 に示した（Gene Bank Accession Number:J03143）。また、IL-18R α 鎖遺伝子と、これがコードする IL-18R α 鎖蛋白質については、す

でに解析がなされている (Parnet P, J Biol Chem, 271:3967-3970, 1996)。この IL-18R α 鎖遺伝子 cDNA の塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号 4 に示した (Gene Bank Accession Number: U43672)。

特定の遺伝子の変異と、これらの変異遺伝子がコードして産生される変異蛋白質により惹起されると考えられる現象、すなわち、種々のアレルギー性疾患（例えば、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー等）との関係を具体的に解析することにより、本遺伝子検出方法において利用し得る、IL-12R β 2 鎖遺伝子と、IL-12R β 1 鎖遺伝子と、IL-18R α 鎖遺伝子と、INF γ R 1 鎖遺伝子における遺伝子変異を見い出すことができる。すなわち、アレルギー（アトピー）性疾患と健常人等の組み合わせにおいて、IL-12R β 2 鎖遺伝子と、IL-12R β 1 鎖遺伝子と、IL-18R α 鎖遺伝子と、INF γ R 1 鎖遺伝子の変異部位と変異頻度、あるいは、その変異により生ずる蛋白質の機能を解析することにより、所望する遺伝子変異を見出すことができる。かかる作業の実際については、後述する実施例において、具体的に記載する。

なお、本発明において、「遺伝子変異」とは、ヒト染色体における遺伝子の変異を意味するものであり、遺伝子の塩基配列が野生型（正常遺伝子の塩基配列）と異なる場合のことを意味するものである。また、遺伝子が、その塩基配列において、個体毎に異なる特異的な部位を保有している場合には、一般的にこれは、「遺伝子多型」として表現され得るが、本発明においては、この「遺伝子多型」も「遺伝子変異」の範疇に含まれるものとする。また、ゲノム DNA においては認められず、ゲノム DNA から、mRNA 前駆体を経て、mRNA になる過程（主に、mRNA 前駆体のスプライシングの過程）で生ずる変異（この変異は、主に cDNA における変異として特定され得る）も、「遺伝子変異」の範疇に含まれることとする。「遺伝子変異」は、その遺伝子の変異頻度、その mRNA の発現量、蛋白発現量、あるいは蛋白質の機能等の多角的な解析により、同定される。

本発明者は、前述したように、現在までに、IL-12R β 2 鎖遺伝子と、IL-12R β 1 鎖遺伝子と、IL-18R α 鎖遺伝子と、INF γ R 1 鎖遺伝子において見い出され、アレルギー素因と関連が認められる遺伝子変異として、

1. IL-12R β 2 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R β 2 鎖蛋白質の 313 番目のアルギニンをコードする部位の変異（例えば、IL-12R β 2 鎖遺伝子の 937 番

目の塩基であるアデニンがグアニンに置換していることによる、上記の 3 1 3 番目のアルギニンのグリシンへの置換等)、

2. IL-12R β 2 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R β 2 鎖蛋白質の 6 0 4 番目のアラニンをコードする部位の変異 (例えば、IL-12R β 2 鎖遺伝子の 1 8 1 1 番目の塩基であるシトシンがチミンに置換していることによる、上記の 6 0 4 番目のアラニンのバリンへの置換等)、

3. IL-12R β 2 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R β 2 鎖蛋白質の 6 1 9 番目のグリシン以降のアミノ酸が欠失する変異 (例えば、IL-12R β 2 鎖遺伝子の 1 8 5 6 ~ 1 9 4 6 番目の塩基の欠失変異等)、

4. IL-12R β 2 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R β 2 鎖蛋白質の 7 2 0 番目のヒスチジンをコードする部位の変異 (例えば、IL-12R β 2 鎖遺伝子の 2 1 5 9 番目の塩基であるアデニンがグアニンに置換していることによる、上記の 7 2 0 番目のヒスチジンのアルギニンへの置換等)、

5. IL-12R β 1 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R β 1 鎖蛋白質の 3 6 1 番目のアルギニンをコードする部位の変異 (例えば、IL-12R β 1 鎖遺伝子の 1 0 8 1 番目の塩基であるシトシンがチミンに置換していることによる、上記の 3 6 1 番目のアルギニンのトリプトファンへの置換等)、

6. IL-12R β 1 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R β 1 鎖蛋白質の 3 6 5 番目のメチオニンをコードする部位の変異 (例えば、IL-12R β 1 鎖遺伝子の 1 0 9 4 番目の塩基であるチミンがシトシンに置換していることによる、上記の 3 6 5 番目のメチオニンのスレオニンへの置換等)、

7. IL-12R β 1 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R β 1 鎖蛋白質の 3 7 8 番目のグリシンをコードする部位の変異 (例えば、IL-12R β 1 鎖遺伝子の 1 1 3 2 番目の塩基であるグアニンがシトシンに置換していることによる、上記の 3 7 8 番目のグリシンのアルギニンへの置換等)、

8. IL-18R α 鎖遺伝子によってコードされる IL-18R α 鎖蛋白質の 3 1 7 番目のアラニンが欠失する変異 (IL-18R α 鎖遺伝子の 9 5 0 ~ 9 5 2 番目の塩基の欠失変異)、

9. INF- γ R 1 鎖遺伝子によってコードされるインターフェロン γ R 1 鎖蛋白質の 4 6 7 番目のロイシンをコードする部位の変異 (例えば、INF- γ R 1 鎖遺伝子

の1400番目の塩基であるチミンがシトシンへの置換することによる、上記の467番目のロイシンのプロリンへの置換等)、が挙げられる。

遺伝子変異部位における変異の検出方法としては、通常公知の方法、例えば、サザンブロット法を用いたRFLP法や、PCR-RFLP法、HET(heteroduplex analysis)法、DGGE法(denaturing gradient gel electrophoresis)法、DS(direct sequence)法、CCM(chemical cleavage mismatch)法、CDI(carbodiimid modification)法、さらにはPCR法を用いた一本鎖DNA高次構造多型解析法[PCR-SSCP(single-stranded conformation polymorphism)法、以下、本明細書においてはSSCP法という]、PCR/GC-clamp法、インベーター・アッセイ法[Third Wave Technologies 社(米国)]等を用いることができる[例えば、バイオマニュアルシリーズ1, 遺伝子工学の基礎技術, 山本 雅編, 羊土社(1993)等を参照のこと、特に、PCR/GC-clamp法については、Myers, R. M., Sheffield, V., and Cox, D. R. (1988) in Genomic Analysis: A Practical Approach. K. Davies, ed. IRL Press Limited, Oxford, pp. 95-139 等を参照のこと]が、簡便かつ正確に遺伝子変異を特定し得るという点において、インベーター・アッセイ法を選択することが好ましい。

第1図は、このインベーター・アッセイ法のあらましを略図化した図面である。

第1図において、鋳型ヌクレオチド鎖11[野生型遺伝子(ゲノムDNAの塩基配列であっても、cDNAの塩基配列であってもよい)]に対して、まず、第1のヌクレオチド鎖12をハイブリダイズさせる。

第1のヌクレオチド鎖12は、鋳型ヌクレオチド鎖11における、変異検出対象塩基[本図では、野生型がT(チミン)]に相補的な塩基[本図では、A(アデニン)]が3'末端に位置する、鋳型ヌクレオチド鎖11に対して相補的なヌクレオチド鎖である(なお、この例では、第1のヌクレオチド鎖12の3'末端の塩基は、変異検出対象塩基に対して相補的であるが、たとえ相補的塩基ではなくても、その塩基が、変異検出対象塩基と第2のヌクレオチド鎖の会合反応に干渉することにより、部分的三重鎖構造が形成され得る)。

次いで、この鋳型ヌクレオチド鎖11と第1のヌクレオチド鎖12との部分的2本鎖に対して、さらに、第2のヌクレオチド鎖13をハイブリダイズさせる。

第2のヌクレオチド鎖13は、鋳型ヌクレオチド鎖11に対して相補的な「相

補的部分」131が、3'側にあり、これと連続して、検出要素が設けられた、鋳型ヌクレオチド鎖に対して非相補的な「検出用部分」132が、5'側にある、複合的ヌクレオチド鎖であり、「相補的部分」131の最も5'側の塩基は、変異検出対象塩基(T)に対して相補的な塩基(A)となっている。

この第2のハイブリダイズ反応によって、鋳型ヌクレオチド鎖11の変異検出対象塩基部分(T)は、第1のヌクレオチド鎖12の3'末端塩基と、第2のヌクレオチド鎖の「相補的部分」131の最も5'側の塩基(A)との、部分的三重鎖構造が形成されることとなる。

次いで、この部分的三重鎖構造を、その3'側で特異的に切断する活性を有するヌクレアーゼ14を作用させて、このヌクレアーゼにより切断された、第2のヌクレオチド鎖13の検出用部分132'〔3'末端が、変異検出対象塩基(T)に対して相補的塩基(A)となっている〕を検出することにより、鋳型ヌクレオチド鎖11が、野生型であることを検出することができる。

本図においては、5'末端近傍に蛍光色素151とその3'側の近傍に蛍光消光物質(クエンチャー)152を標識した、ヘアピン型プローブ(ヌクレオチド鎖)15を、上記のハイブリダイズ系と共存させることにより、上記の野生型の検出が可能である。

ヘアピン型プローブ15の3'側の一本鎖部分は、第2のヌクレオチド鎖13の検出用部分132に対して相補的に設計されており、かつ、かかる一本鎖部分の最も5'側の塩基に隣合うさらに5'側の一塩基は、変異検出対象塩基(T)となっている。そして、検出用部分132'が、ヘアピン型プローブ15の一本鎖部分とハイブリダイズすると、検出用部分132'の3'末端の塩基(A)が、ヘアピン型プローブ15の二本鎖部分の先端において、再び、部分的三重鎖構造を形成する。これに対し、再度、ヌクレアーゼ14が作用して、ヘアピン型プローブ15における、蛍光色素151と蛍光消光物質152の間が切断され、蛍光色素151が遊離し、蛍光消光物質152による蛍光消光作用から開放されて、本来の蛍光が検出可能な状態となる。この蛍光を検出することにより、鋳型ヌクレオチド鎖11が、変異検出対象塩基において変異が認められない野生型遺伝子であることを検出することができる。

これに対して、鋳型ヌクレオチド11の変異検出対象塩基が、野生型の塩基(T)

ではなく、例えば、G（グアニン）であるSNP塩基であり、これをポジティブに検出する場合には、第1のヌクレオチド鎖12と第2のヌクレオチド鎖13における、相補的塩基を、上記のAから、Gに相補的なC（シトシン）として、さらに、ヘアピン型プローブ15における蛍光色素151と蛍光消光物質152を、上記の系とは異なる蛍光を発色する蛍光色素と、これに対する蛍光消光物質とすることにより、鋳型ヌクレオチド鎖11におけるSNPsを、異なる蛍光色素の蛍光によって検出することが可能である。

また、鋳型ヌクレオチド11が、野生型塩基と変異型塩基を有するものが、混在する場合（ヘテロ型）は、上記の2種類の蛍光の混合型蛍光として、ポジティブに検出することも可能である。

なお、ここには、ヘアピン型プローブを用いた検出システムを例示したが、これ以外にも、例えば、検出用部分132に、直接、蛍光標識やアイソトープ標識を行って、直接、検出用部分を検出することにより、遺伝子変異を検出することも可能である。さらに、ここでは、遺伝子変異を有する場合も、そうでない場合も、ポジティブに検出する例を示したが、いずれかの場合においては、蛍光等の標識が検出されない、ネガティブな検出を行うことも可能である。

上述したインベーター・アッセイ法は、技術的には、反応の進行に伴い、部分的三重鎖構造を特異的に切断するヌクレアーゼが、第2のヌクレオチド鎖の「検出用部分」を切り出す段階において（ヘアピン型プローブを用いる場合には、標識された蛍光物質を蛍光消光物質と切り離す段階においても）、連続的に働くため、蛍光等の、インベーター・アッセイ法において用いる標識が増感される、極めて鋭敏な液相反応である。

PCR/GC-clamp法は、DGGE法（DNA変性剤の直線的な濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルにおける、塩基置換を含む二本鎖DNA断片と含まない二本鎖DNA断片の、DNAを変性させるべきDNA変性剤濃度の相違に基づく移動度の差異を利用して、DNAの塩基置換を検出する方法）の変法であり、DGGE法における、「複数の塩基置換がある場合に、ポリアクリルアミドゲルにおいて、最後に融解するドメインの塩基置換を検出することができない」という欠点を、GC含量の高い領域（GC-clamp）を、塩基置換の検出対象であるDNA断片につなげることにより克服した方法である〔Sheffield, V.C. et al.

(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:232-236等を参照のこと〕。

よって、PCR/GC-clamp法の基本的操作等は、DGGE法に準ずるが、塩基置換検出の対象となるDNA断片に、GC-clampを付加する工程が必要となる。

本遺伝子検出方法における、IL-12R β 2鎖遺伝子と、IL-12R β 1鎖遺伝子と、IL-18R α 鎖遺伝子と、INF γ R1鎖遺伝子の変異の検出の対象となるDNAの出所は、特に限定されるべきものではなく、被験者の体細胞であれば、特に限定されない。例えば、末梢血や白血球等の血液検体を、本発明において好適に選択することができる。

すなわち、被験者の検体細胞（分離後、培養したものを用いることもできる）から、公知の方法を用いてゲノムDNAを抽出し、このゲノムDNAにおいて、特定の遺伝子部位における遺伝子変異（具体的には、特定の遺伝子部位における塩基の置換、欠失、挿入等）を検出することができる。また、被験者の検体細胞（分離後、培養したものを用いることもできる）から、公知の方法を用いて、mRNAを抽出し、このmRNAを鋳型として得られるcDNAにおける変異を検出することも可能である。

そして、この検出作業の結果、上述した特定の遺伝子部位に変異が認められた場合、この遺伝子部位の変化と、アレルギー（アトピー）の素因と関連付けて、被験者が発症する蓋然性の高いアレルギー（アトピー）疾患の種類や、現に発症しているアレルギー（アトピー）疾患の原因を特定することができる。

本遺伝子検出方法を行う態様は、特に限定されず、選択する遺伝子変異の検出方法に応じて適宜選択することができる。典型的には、本遺伝子検出方法を行うための要素が備わっている、遺伝子変異検出用キットを用いて行うことが可能である。具体的には、例えば、ウェルが設けられているマイクロプレートの個々のウェルに、本遺伝子検出方法を行うために必要な材料や試薬を組み合わせ、遺伝子変異の検出反応を行い、かかる検出反応により、所望する遺伝子変異を検出することができる。また、マイクロプレートに代えて、いわゆるマイクロアレイを用いて、遺伝子変異の検出を、さらに集約的に行うことも可能である。このように、この遺伝子変異検出用キットは、マイクロプレートやマイクロアレイ等の遺伝子検出を行う器具、試薬、希釈液等を、必要に応じて組み合わせ、その構

成要素とすることができる。

本遺伝子検出方法を行うことによって、例えば、特定の遺伝子部位に変異が認められる場合には、被験者において、アレルギー（アトピー）の素因が認められ、現時点で、被験者に異常がなくても、アレルギー（アトピー）疾患を発症するリスクが高いことを明らかにすることができる。このような場合、環境因子対策（例えば、ハウスダスト対策や、非アレルギー食物の摂取等）を行うことによって、アレルギー（アトピー）疾患の発症を予防することが可能である。

また、例えば、既に、アレルギー（アトピー）疾患を発症している被験者に対して、本遺伝子検出方法を行うことにより、その疾患に対する原因遺伝子異常を、高い確度で推定することが可能である。このような場合、特定された遺伝子異常に対応した治療方法を選択することにより、より効果的なアレルギー（アトピー）疾患の治療を行うことができる。

さらに、原因遺伝子異常がアレルギー（アトピー）疾患を惹起するメカニズムを明らかにすることにより、かかるメカニズムに対応した、アレルギー（アトピー）の治療薬の開発の途を提供することも可能である。

実施例

以下、実施例により、本発明を、さらに具体的に説明するが、これにより、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

[遺伝子の解析法]

末梢血単核球の分離および培養

末梢血単核球は静脈より血液を5 mlヘパリン採血し、ヘパリン血をFicoll（シグマ社製）に重層し、比重遠心により分離した。分離した単核球は10%ウシ胎児血清、2 mmol/l L-グルタミン、100 U/mlペニシリン、および100 U/mlストレプトマイシン含有RPMI1640培地にて細胞数 1×10^6 個/mlの濃度にして、5%CO₂存在下で培養した。単核球の刺激は、10 μ g/mlフィトヘマアグラチニン（PHA、Gibco BRL社製）、あるいは5 IU/ml IL-12（R&D社製）、あるいは400 IU/ml IL-18（MLB社製）を培地に添加し、行なった。

サイトカインの定量

刺激した単核球は、24時間培養後、回収し、遠心により細胞画分を取り除き、

培養上清を得た。得られた培養上清中のINF- γ 量は、ELISAキット（大塚アッセイ社製）を用いて測定した。

RNA抽出およびRT-PCR

RNAは、24時間PHA刺激した培養単核球を回収し、Isogenキット（日本ジーン社製）を用いて抽出し、さらに、これを用いて、常法により、cDNAの合成を行った。IL-12R β 1鎖、IL-12R β 2鎖、IL-18R α 鎖、およびINF- γ R1鎖の、それぞれのcDNAのRT-PCR増幅は、それぞれ、特異的なプライマーセット（下記第1表）を用いて行なった。PCR反応は94℃で1分間、54℃で1分間、72℃で1分間のサイクルで、40サイクル行なった。

第 1 表

配列	レセプター	プライマーシーケンス
1	IL-12R β 1鎖	5'-CTCCTCGAACCAATTTGGTC-3'
2	IL-12R β 1鎖	5'-CTGCACTTCGATGCTGAAGC-3'
3	IL-12R β 2鎖	5'-CGGAGTTCTATACCAGAGTTG-3'
4	IL-12R β 2鎖	5'-ACATCTAACATCCCAGTAGGC-3'
5	IL-12R β 2鎖	5'-GATGACAGCTCTGACAGCTG-3'
6	IL-12R β 2鎖	5'-GGCCTGATGACCTTGGATT-3'
7	IL-18R α 鎖	5'-CTGCTCTGCTTTGCTGAATG-3'
8	IL-18R α 鎖	5'-TCCTCTTGTAAGACGTGGC-3'
9	INF- γ R1鎖	5'-CGTCATACCAGCCATTTTCC-3'
10	INF- γ R1鎖	5'-TTGGTGCAACTTAGCTGATC-3'

配列1～10は、それぞれ、後述する配列表の配列番号5～14に対応する。

塩基配列の決定

それぞれのPCR産物はT-vector（Novagen社製）に組み込み、組み込まれたベクターを大腸菌（JM109株）に導入し、導入大腸菌株をクローニングした。クローニングした大腸菌よりプラスミドを抽出し、シーケンス等により、フラグメントの塩基配列を決定した。

〔臨床における解析〕

アレルギー（アトピー）疾患の患者75名（以下、アレルギー（アトピー）疾患の患者の抽出集団を「アレルギー群」ともいう）について、非アレルギー（アト

ピー）疾患の健常者 62 名（以下、非アレルギー（アトピー）疾患の健常者の抽出集団を「非アレルギー群」ともいう）を対照として、末梢血単核球を分離し、IL-12、あるいはPHA刺激したときのINF- γ 産生量を測定した。

PHA刺激によるINF- γ 産生量は、非アレルギー群において116～10338 pg/ml（平均2886 pg/ml）であるのに対し、アレルギー群においては、46～10000 pg/ml（平均1324 pg/ml）と低下していた。また、IL-12刺激におけるINF- γ 産生量は、非アレルギー群が、55～10000 pg/ml（平均971 pg/ml）、アレルギー群が、検出限界以下から1130 pg/ml（平均145 pg/ml）と有意に低下が認められた。アレルギー（アトピー）疾患の患者 75 名のうち、24 名は、IL-12刺激によるINF- γ 産生量が、検出限界以下であった。このINF- γ 産生量が、検出限界以下を呈したアレルギー（アトピー）疾患例について、IL-12R β 2鎖の遺伝子を検索した。その結果、下記の遺伝子変異が特定された。

遺伝子変異 1（第 2 図参照）

第 2 図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R β 2鎖遺伝子の937番目の塩基Aが、Gに置換しており、この塩基置換により、IL-12R β 2鎖蛋白質の313番目のアミノ酸Arg（AGA）が、Gly（GGA）に置換する変異であった（R313G変異）。

後述するように、この例のような、IL-12R β 2鎖遺伝子によってコードされるIL-12R β 2鎖蛋白質の313番目のArgをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

遺伝子変異 2（第 3 図参照）

第 3 図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R β 2鎖遺伝子の1811番目の塩基Cが、Tに置換しており、この塩基置換により、IL-12R β 2鎖蛋白質の604番目のアミノ酸Ala（GCT）が、Val（GTT）に置換する変異であった（A604V変異）。

後述するように、この例のような、IL-12R β 2鎖遺伝子によってコードされるIL-12R β 2鎖蛋白質の604番目のAlaをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

遺伝子変異 3（第 4 図参照）

第 4 図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるよう

に、この遺伝子変異は、IL-12R β 2鎖遺伝子の1856番目から1946番目の91塩基が欠失しており、フレームシフトにより欠失部位下流45番目のアミノ酸が、ストップコドン（TAG）に置換しているものであった。この91塩基の欠失により、アミノ酸623個の異常なIL-12R β 2鎖蛋白質が産生されることが予想される（1856del91変異）。

後述するように、この例のような、IL-12R β 2鎖遺伝子によってコードされるIL-12R β 2鎖蛋白質の619番目のグリシン以降のアミノ酸が欠失する変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

遺伝子変異4（第5図参照）

第5図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R β 2鎖遺伝子の2159番目の塩基Aが、Gに置換しており、この塩基置換によりIL-12R β 2鎖蛋白質の720番目のアミノ酸His（CAT）がArg（CGT）に置換する変異であった（H720R変異）。

後述するように、この例のような、IL-12R β 2鎖遺伝子によってコードされるIL-12R β 2鎖蛋白質の720番目のHisをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

これらの遺伝子変異1～4が認められた被験者より、上述のごとく末梢血単核球を分離し、IL-4、INF- γ 、およびIL-12存在下にて細胞を培養し、培養上清中に分泌されたIgE量を測定した。その結果、このような変異が認められないアレルギー（アトピー）疾患の患者に由来する単核球においては、IL-4により惹起されるIgE産生が、INF- γ 、あるいはIL-12共存下において抑制されたのに対し、これらの変異を有するアレルギー（アトピー）疾患の患者に由来する単核球においては、INF- γ 共存下において、IgE産生が抑制されたが、IL-12共存下においてはその抑制が認められなかった（第6図）。このことは、IL-12を介したINF- γ 産生系の情報伝達における過程において異常が生じ、INF- γ が産生されていないことを意味し、IL-12Rに機能的異常が存在することを示している。

以上の結果より、遺伝子変異1～4により、IL-12Rに異常が生じ、その結果、INF- γ の産生が出来ず、INF- γ によるIgE産生が、十分に抑制されないことが示された。また、遺伝子変異1～4は、アレルギー（アトピー）疾患の症例において、有意（ $P=0.0179$ ）に高い頻度で出現していることが示された。

さらに、IL-12R β 2鎖遺伝子における変異1、3、4は、IL-12刺激によるINF- γ 産生量が、検出限界以下であったアレルギー（アトピー）疾患の症例24名のうち、10名（1856del91変異8名、R313G変異1名、H720R変異1名）に検出されたが、健常者72名にはいずれの変異も検出されなかった（第2表）。同様に、A604V変異出現頻度は、アレルギー（アトピー）疾患の症例において有意（ $P < 0.001$ ）に高いことが示された（第3表）。

第 2 表

対象	数（人）	ヘテロ接合体			計
		R313G変異	1856del91変異	H720R変異	
非アレルギー群	62	0	0	0	0
アレルギー群	75	1	8	1	10
IFN- γ 産生量					
<20 pg/ml	24	1	8	1	10
≥ 20 pg/ml	51	0	0	0	0

第 3 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=104)	アレルギー群 (n=102)	計 (n=206)
A604V			
C/C	100	81	181
T/C	4	21*	25

* $P < 0.001$

さらに下記のIL-12R β 1鎖遺伝子の変異5～7の存在が明らかになった（第4表参照）。

遺伝子変異5（第7図参照）

第7図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R β 1鎖遺伝子の1081番目の塩基CがTに置換しており、この塩基置換により、IL-12R β 1鎖蛋白質の361番目のアミノ酸Arg（CGG）が、Trp（TGG）に置換する変異であった（R361W変異）。

後述するように、この例のような、IL-12R β 1 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R β 1 蛋白質の 361 番目の Arg をコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

遺伝子変異 6（第 8 図参照）

第 8 図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R β 1 鎖遺伝子の 1094 番目の塩基 T が C に置換しており、この塩基置換により IL-12R β 1 鎖蛋白質の 365 番目のアミノ酸 Met (ATG) が Thr (ACG) に置換する変異であった (M365T 変異)。

後述するように、この例のような、IL-12R β 1 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R β 1 鎖蛋白質の 365 番目のメチオニンをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

遺伝子変異 7（第 9 図参照）

第 9 図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-12R β 1 鎖遺伝子の 1132 番目の塩基 G が C に置換しており、この塩基置換により IL-12R β 1 鎖蛋白質の 378 番目のアミノ酸 Gly (GGG) が Arg (CGG) に置換する変異であった (G378R 変異)。

後述するように、この例のような、IL-12R β 1 鎖遺伝子によってコードされる IL-12R β 1 鎖蛋白質の 378 番目のグリシンをコードする部位の変異は、被験者のアレルギー素因と関連する変異であることが明らかになった。

第 4 表に、上記の 3 種類の、IL-12R β 1 鎖遺伝子の変異の頻度を示した。アレルギー（アトピー）疾患の患者では、健常者に比べて、いずれも高頻度の変異が認められた。

第 4 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=50)	アレルギー群 (n=45)
R 3 6 1 W		
C/C	5 0	4 4
T/C	0	1
T/T	0	0
M 3 6 5 T		
T/T	3 3	2 2
C/T	5	8
C/C	1 2	1 5
G 3 7 8 R		
G/G	3 3	2 2
C/G	5	8
C/C	1 2	1 5

さらに、IL-18R α 鎖遺伝子の変異について解析を行ったところ、アレルギー素因と関連する、下記の新たな変異が認められた。

遺伝子変異 8 (第10図参照)

第10図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、IL-18R α 鎖遺伝子の950番目から952番目の3塩基CAGが欠失しており(950del3)、IL-18R α 鎖蛋白質の317番目のアミノ酸Ala1個を欠いた、540個のアミノ酸残基からなる異常な蛋白質の合成が認められる変異であると考えられる。また、この変異は、ゲノムDNAの塩基配列には検出されないことから、オルターネイティブスプライシングによって生じるものと考えられた。

本変異8を有するアレルギー（アトピー）疾患患者、および、本変異8が認められないアレルギー（アトピー）疾患患者より、上述のごとく末梢血単核球を分離し、IL-4、およびIL-18存在下にて細胞を培養し、培養上清中に分泌されたIgE量を測定した。その結果、本変異8が認められないアレルギー（アトピー）疾患患者に由来する単核球においては、IL-4により惹起されるIgE産生がIL-18濃度依存的に抑制されるのに対して、本変異8を有する患者由来単核球においてはIL-18

共存による抑制が認められなかった（第11図）。

このことは、本変異8が認められる者は、IL-18を介する情報伝達により産生されるINF- γ による抑制がなされていないことを表し、IL-18Rに機能的異常が存在することを示している。この結果より、本遺伝子変異8により、IL-18Rに異常を生じ、INF- γ の産生が出来ず、INF- γ によるIgE産生の抑制が機能しないことが示された。また、本変異は、アレルギー（アトピー）疾患症例において有意（ $P=0.0179$ ）に高い頻度で出現していることが示された（第5表）。

第 5 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=41)	アレルギー群 (n=39)	計 (n=80)
950del3			
wild/wild	9	4*	13
del3/wild	30	26*	56
del3/del3	2	9*	11

* $P=0.0179$

さらに、INF- γ R1鎖遺伝子の変異について解析を行ったところ、アレルギー素因と関連する、下記の新たな変異が認められた。

遺伝子変異 9（第12図参照）

第12図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子変異は、INF- γ R1鎖遺伝子の1400番目の塩基Tが、Cに置換しており、この塩基置換により、INF- γ R1鎖蛋白質の467番目のアミノ酸Leu（CTT）がPro（CCT）に置換していた（L467P変異）。このL467P変異はSTAT1結合部の近傍に生じていることから、本変異9により、重要な情報伝達分子である、STAT1が結合できなくなり、シグナルの伝達が抑制されるものと考えられる。

また、本変異9の家系解析より、本変異9は 気管支喘息、あるいはアトピー性皮膚炎の疾患を有する家族にのみ認められることから、このL467P変異に代表される、INF- γ R1鎖蛋白質の467番目のロイシンをコードする部位の変異は、気管支喘息、あるいはアトピー性皮膚炎に特徴的な遺伝子変異であると考えられる（第13図：図中、BAは、気管支喘息を表し、ARは、アレルギー性鼻炎を表す）。

さらに、アレルギー（アトピー）疾患症例114名と非アレルギー（アトピー）群102名を対象に、L467P変異について検討したところ、本変異9は、アレルギー（アトピー）疾患症例6名（2.8%）にのみ変異が検出された。

この結果より、L467P変異は、アレルギー（アトピー）性疾患の原因の一つであることが示された（第6表）。

第 6 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=102)	アレルギー群 (n=14)	計 (n=216)
L467P			
T/T	102	108*	210 (97.2%)
C/T	0	6*	6 (2.8%)
C/C	0	0	0 (0%)

*P=0.033

産業上の利用可能性

本発明により、アレルギーに関連する遺伝子変異を用いた、アレルギー素因を規定している原因遺伝子を検出可能な、遺伝子変異の検出方法が提供される。

請求の範囲

1. 下記1～9で示される遺伝子変異からなる群から選ばれる1～9種の遺伝子変異を検出することにより、被験者のアレルギー素因を検出する、遺伝子変異の検出方法。

1. インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ2鎖蛋白質の313番目のアルギニンをコードする部位の変異。

2. インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ2鎖蛋白質の604番目のアラニンをコードする部位の変異。

3. インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ2鎖蛋白質の619番目のグリシン以降のアミノ酸が欠失する変異。

4. インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ2鎖蛋白質の720番目のヒスチジンをコードする部位の変異。

5. インターロイキン12レセプターβ1鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ1鎖蛋白質の361番目のアルギニンをコードする部位の変異。

6. インターロイキン12レセプターβ1鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ1鎖蛋白質の365番目のメチオニンをコードする部位の変異。

7. インターロイキン12レセプターβ1鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ1鎖蛋白質の378番目のグリシンをコードする部位の変異。

8. インターロイキン18レセプターα鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン18レセプターα鎖蛋白質の317番目のアラニンが欠失する変異。

9. インターフェロングレセプター1鎖遺伝子によってコードされるインターフェロングレセプター1鎖蛋白質の467番目のロイシンをコードする部位の変

異。

2. 請求項1記載の遺伝子変異の検出方法において、1. インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ2鎖蛋白質の313番目のアルギニンをコードする部位の変異、が、インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子の937番目の塩基であるアデニンがグアニンに置換していることによる、上記の313番目のアルギニンのグリシンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

3. 請求項1または2記載の遺伝子変異の検出方法において、2. インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ2鎖蛋白質の604番目のアラニンをコードする部位の変異、が、インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子の1811番目の塩基であるシトシンがチミンに置換していることによる、上記の604番目のアラニンのバリンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

4. 請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において、3. インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ2鎖蛋白質の619番目のグリシン以降のアミノ酸が欠失する変異が、インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子の1856～1946番目の塩基の欠失である、遺伝子変異の検出方法。

5. 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において、4. インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ2鎖蛋白質の720番目のヒスチジンをコードする部位の変異が、インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子の2159番目の塩基であるアデニンがグアニンに置換していることによる、上記の720番目のヒスチジンのアルギニンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

6. 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において、5. インターロイキン12レセプターβ1鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ1鎖蛋白質の361番目のアルギニンをコードする部位の変異が、インターロイキン12レセプターβ1鎖遺伝子の1081番目の塩基であるシトシンがチミンに置換していることによる、上記の361番目のアルギニンのトリプトファンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

7. 請求項1～6のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において、6. インターロイキン12レセプターβ1鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ1鎖蛋白質の365番目のメチオニンをコードする部位の変異が、インターロイキン12レセプターβ1鎖遺伝子の1094番目の塩基であるチミンがシトシンに置換していることによる、上記の365番目のメチオニンのスレオニンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

8. 請求項1～7のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において、7. インターロイキン12レセプターβ1鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ1鎖蛋白質の378番目のグリシンをコードする部位の変異が、インターロイキン12レセプターβ1鎖遺伝子の1132番目の塩基であるグアニンがシトシンに置換していることによる、上記の378番目のグリシンのアルギニンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

9. 請求項1～8のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において、8. インターロイキン18レセプターα鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン18レセプターα鎖蛋白質の317番目のアラニンが欠失する変異が、インターロイキン18レセプターα鎖遺伝子の950～952番目の塩基の欠失である、遺伝子変異の検出方法。

10. 請求項1～9のいずれかに記載の遺伝子変異の検出方法において、9. インターフェロングレセプター1鎖遺伝子によってコードされるインターフェロングレセプター1鎖蛋白質の467番目のロイシンをコードする部位の変異が、インターフェロングレセプター1鎖遺伝子の1400番目の塩基であるチミンがシトシンへの置換することによる、上記の467番目のロイシンのプロリンへの置換である、遺伝子変異の検出方法。

11. 請求項1～10のいずれかに記載の検出方法が、インベーター・アッセイ法を行って遺伝子変異を検出する方法である、遺伝子変異の検出方法。

12. 下記1～9で示される遺伝子変異からなる群から選ばれる1～9種の遺伝子変異を検出するための要素が備わっている、遺伝子変異検出用キット。

1. インターロイキン12レセプターβ2鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン12レセプターβ2鎖蛋白質の313番目のアルギニンをコードする部位の変異。

2. インターロイキン1 2 レセプター β 2 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン1 2 レセプター β 2 鎖蛋白質の6 0 4番目のアラニンをコードする部位の変異。

3. インターロイキン1 2 レセプター β 2 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン1 2 レセプター β 2 鎖蛋白質の6 1 9番目のグリシン以降のアミノ酸が欠失する変異。

4. インターロイキン1 2 レセプター β 2 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン1 2 レセプター β 2 鎖蛋白質の7 2 0番目のヒスチジンをコードする部位の変異。

5. インターロイキン1 2 レセプター β 1 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン1 2 レセプター β 1 鎖蛋白質の3 6 1番目のアルギニンをコードする部位の変異。

6. インターロイキン1 2 レセプター β 1 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン1 2 レセプター β 1 鎖蛋白質の3 6 5番目のメチオニンをコードする部位の変異。

7. インターロイキン1 2 レセプター β 1 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン1 2 レセプター β 1 鎖蛋白質の3 7 8番目のグリシンをコードする部位の変異。

8. インターロイキン1 8 レセプター α 鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン1 8 レセプター α 鎖蛋白質の3 1 7番目のアラニンが欠失する変異。

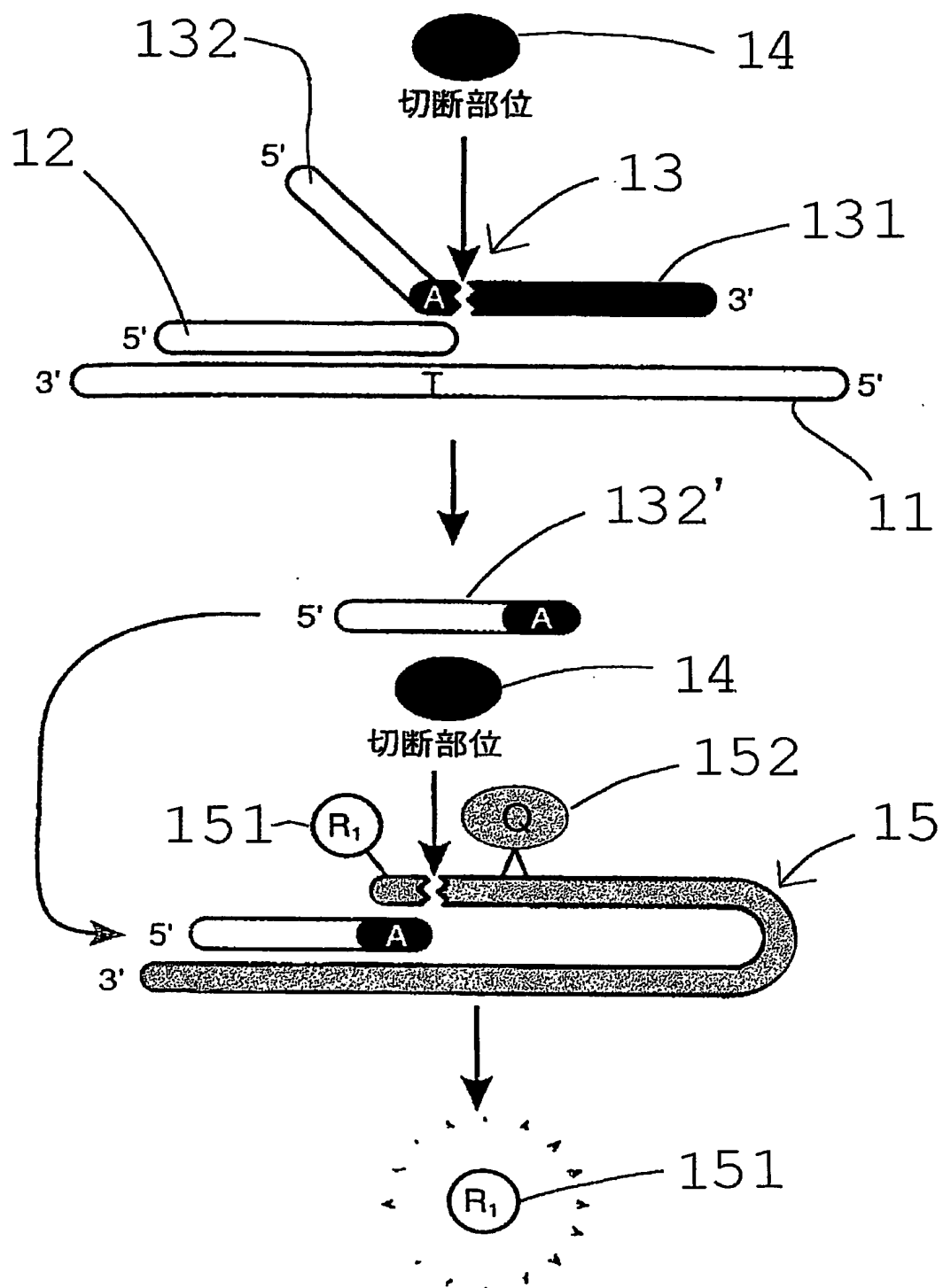
9. インターフェロン γ レセプター1 鎖遺伝子によってコードされるインターフェロン γ レセプター1 鎖蛋白質の4 6 7番目のロイシンをコードする部位の変異。

1 3. 請求項1 2のキットが、インベーター・アッセイ法を行って、遺伝子変異を検出するキットである、遺伝子変異検出用キット。

要約書

アレルギーの素因に関連する遺伝子である、インターロイキン12レセプターIL-1 β 2鎖および β 1鎖遺伝子と、インターロイキン18レセプター α 鎖遺伝子と、インターフェロン γ レセプター1鎖遺伝子における遺伝子変異を検出することにより、アレルギーの素因を検出する、遺伝子変異の検出方法である。これにより、アレルギー性疾患の発症の予防や、アレルギー性疾患の治療に寄与する途を提供する。

第 1 図



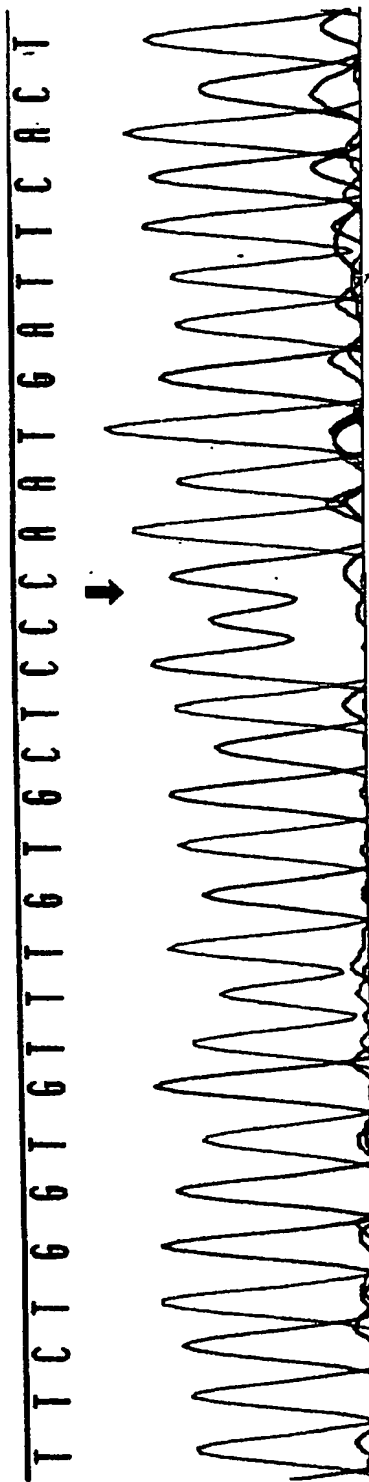
第 2 図

950 940 930
3' - AAGACCACAACACGAGAGTTACTAAGTGA - 5'
GluProThrGlnAlaArgLeuSerGluSer

野生型

315 313 310
GluProThrGlnAlaGlyLeuSerGluSer
3' - AAGACCACAACACGAGGGTTACTAAGTGA - 5'
3' - TTCTGGTGTTGTGCTCCCCAATGATTCACT - 5'
950 940 930

変異型



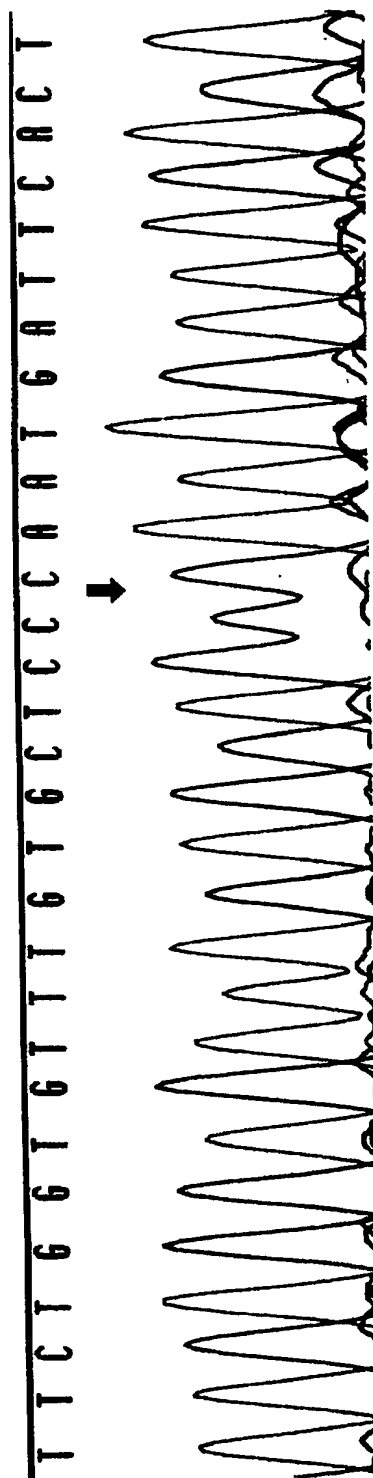
第 2 図

野生型

950 940 930
 3'-AAGACCACAAACACGAGAGTTACTAAGTGA-5'
 GluProThrGlnAlaArgLeuSerGluSer

変異型

315 313 310
 GluProThrGlnAlaGlyLeuSerGluSer
 3'-AAGACCACAAACACGAGGGTTACTAAGTGA-5'
 3'-TTCCTGGTGTTTGTGCTCCCAATGATTCACT-5'
 950 940 930



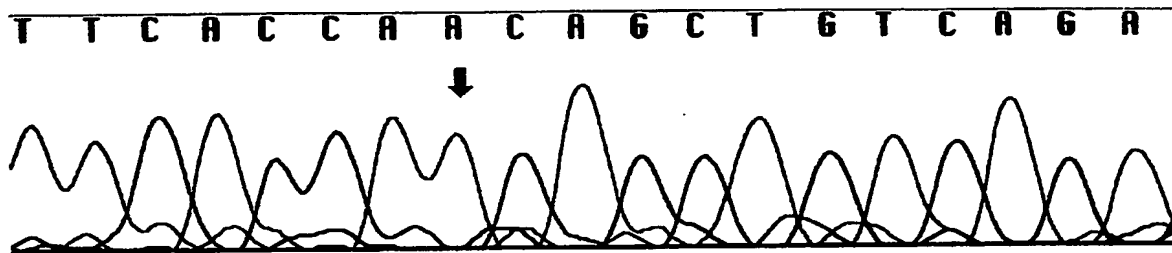
第 3 図

野生型

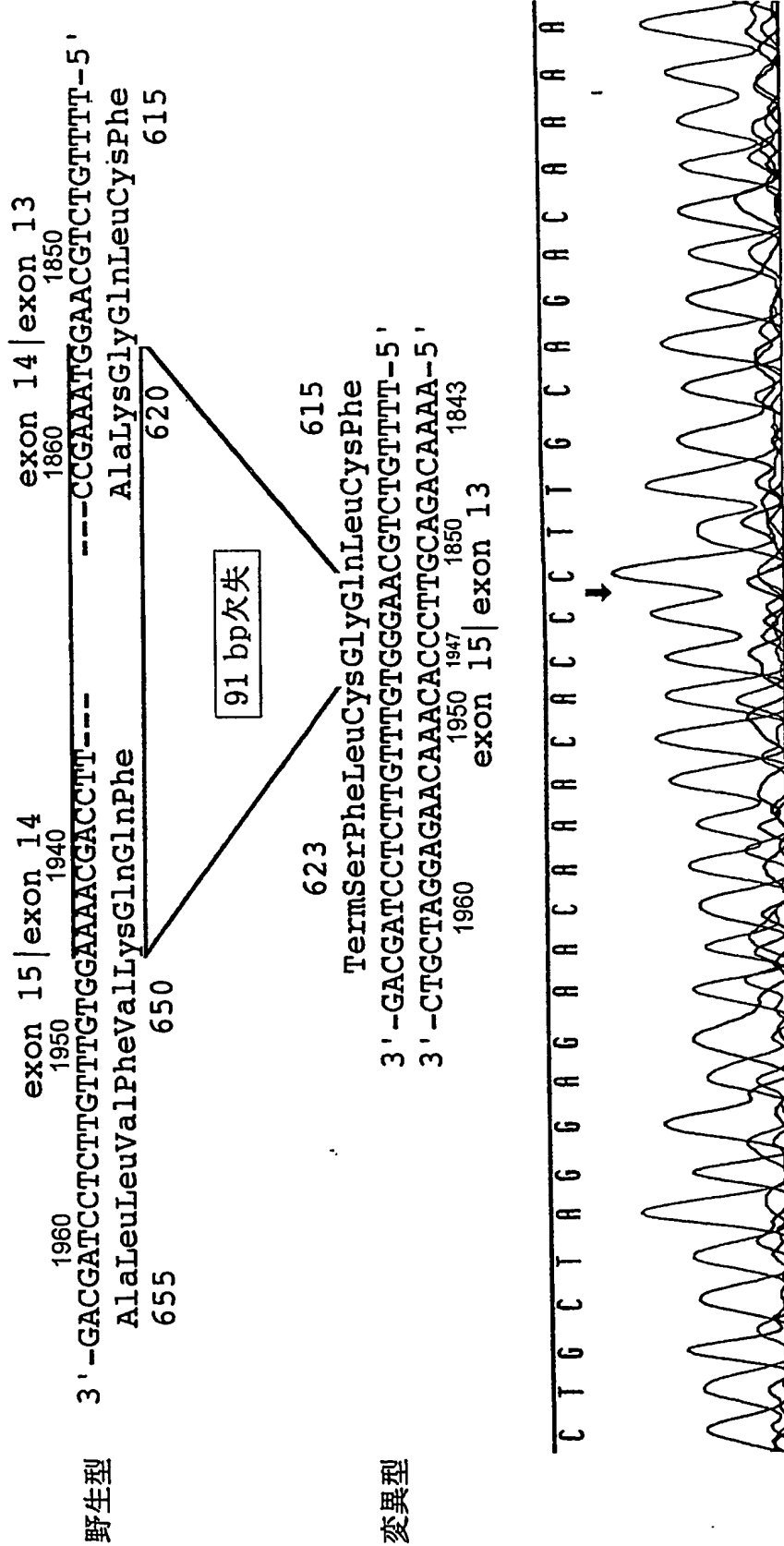
1818 1810 1800
 3'-AAGTGGTCGTCGACAGTCT-5'
 GluGlyAlaAlaThrLeu

変異型

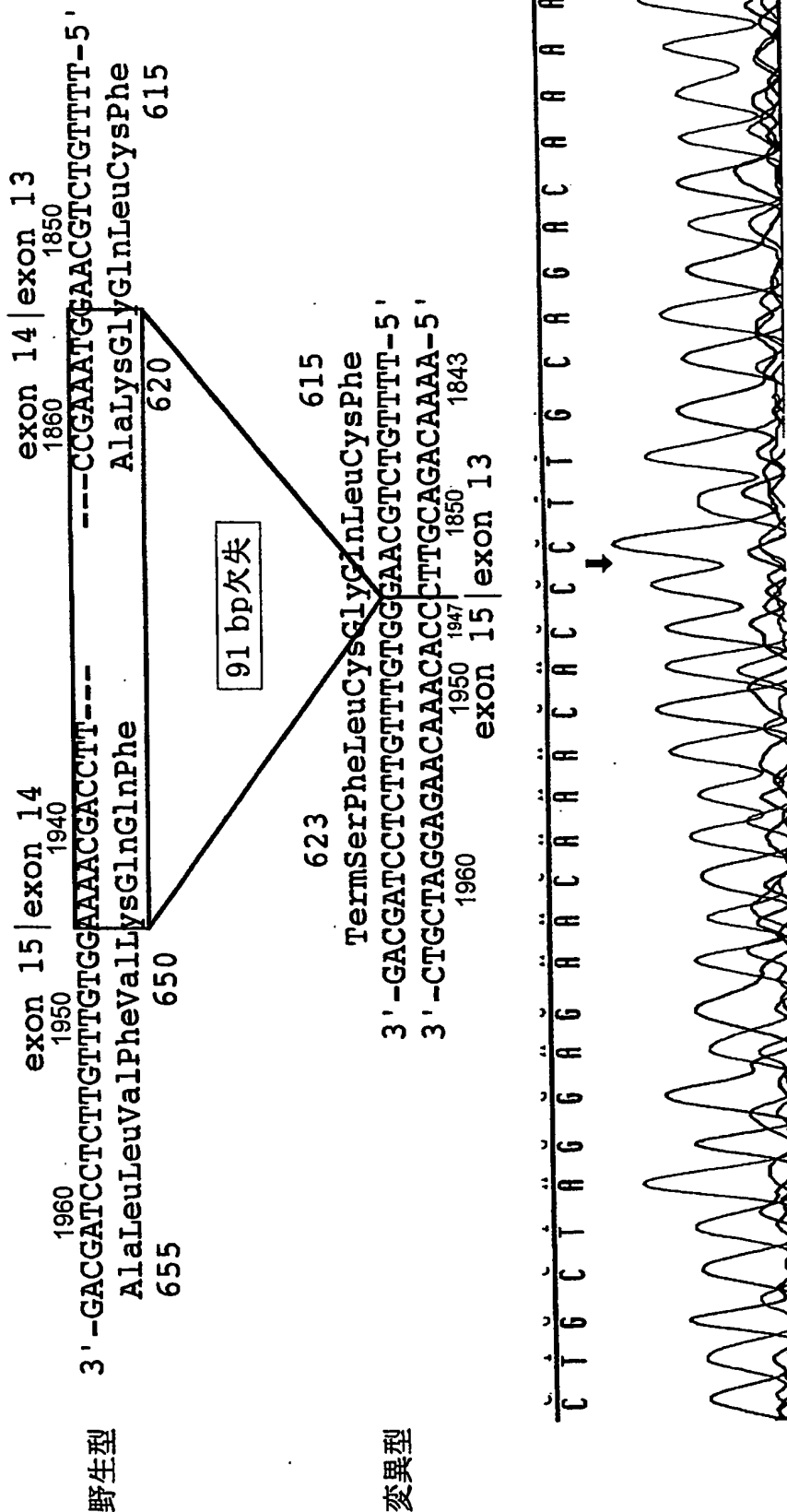
604 601
 GluGlyValAlaThrLeu
 3'-AAGTGGTTGTCGACAGTCT-5'
 3'-TTCACCAACAGCTGTCAGA-5'
 1818 1810 1800



第 4 図



第 4 図



第 5 図

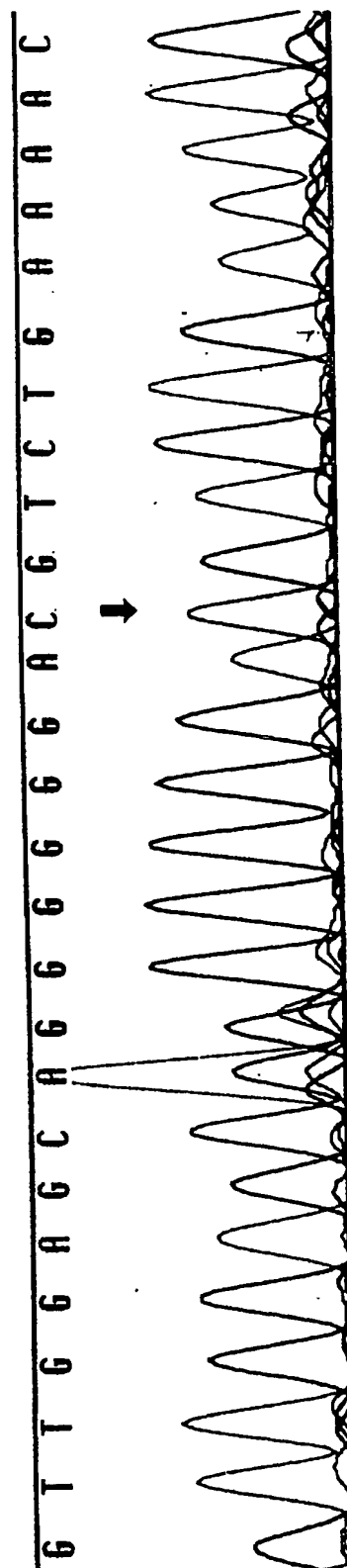
野生型

2170 2160 2150
3' -CAACCTCGTCCCCCTACAGACTTTTG-5'
AsnSerCysProProHisArgPheVal

725 720 717
AsnSerCysProProArgArgPheVal

変異型

2170 2160 2150
3' -CAACCTCGTCCCCCTGCAGACTTTTG-5'
3' -GTTGGAGCAGGGGGGACGCTCTGAAAAC-5'



第 5 図

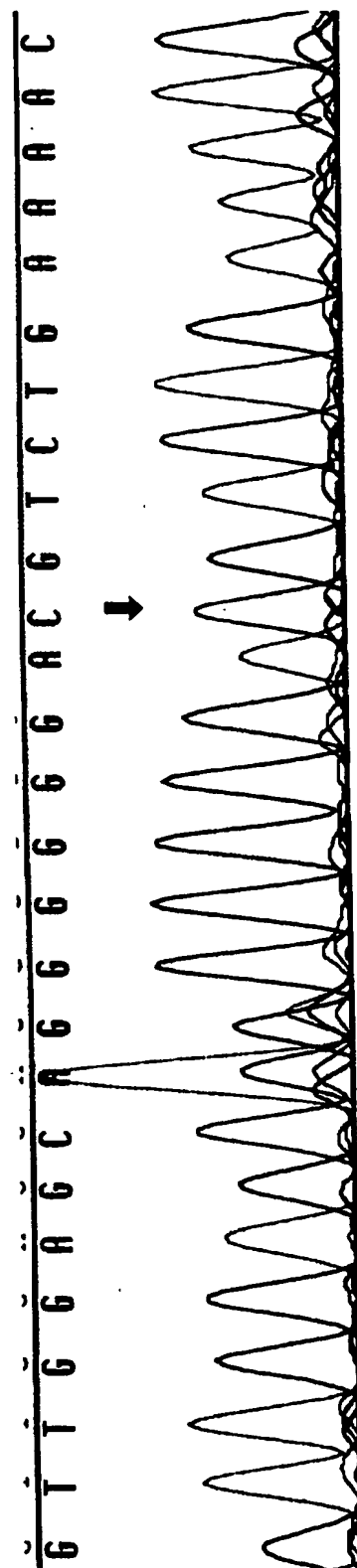
野生型

2170 2160 2150
3' -CAACCTCGTCCCCCTACAGACTTTTG-5'
AsnSerCysProProHisArgPheVal

725 720 717

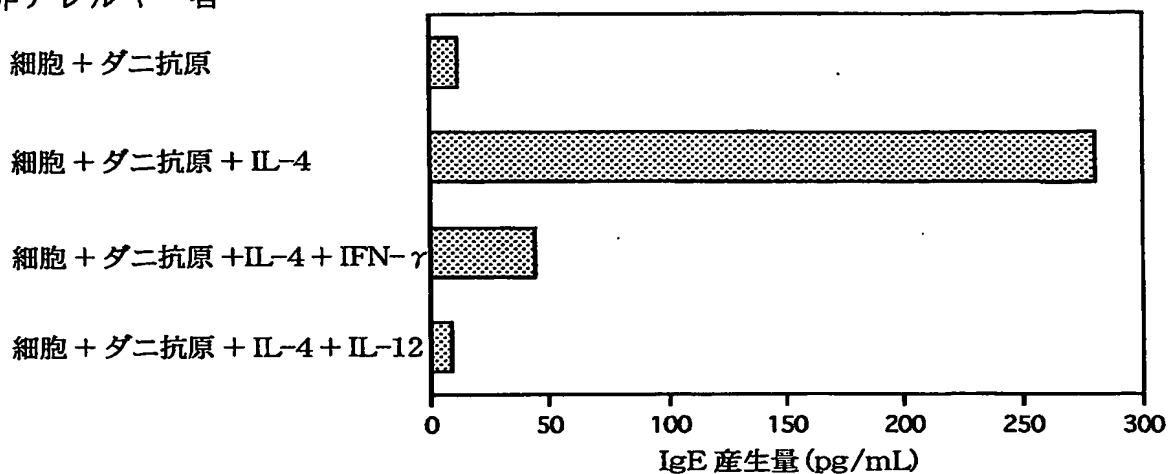
AsnSerCysProProArgArgPheVal
3' -CAACCTCGTCCCCCTGCAGACTTTTG-5'
3' -GTTGAGCAGGGGGGACGCTCTGAAAC-5'
2170 2160 2150

変異型

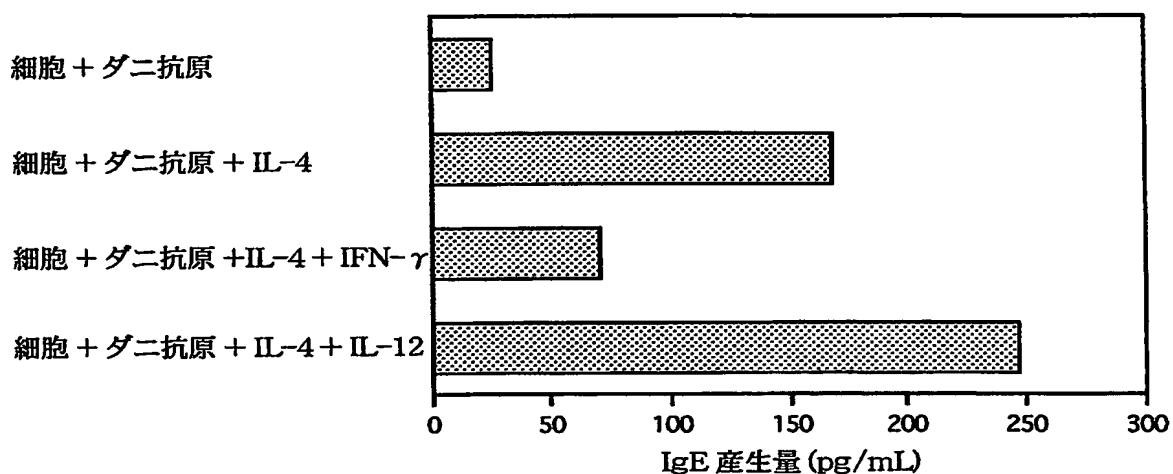


第 6 図

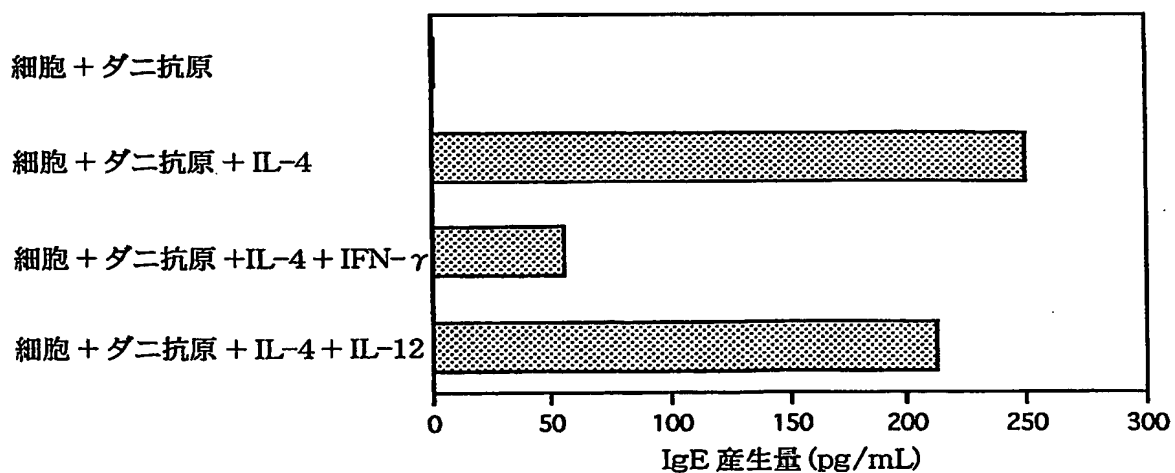
a) 非アレルギー者



b) 1856del91のアレルギー患者



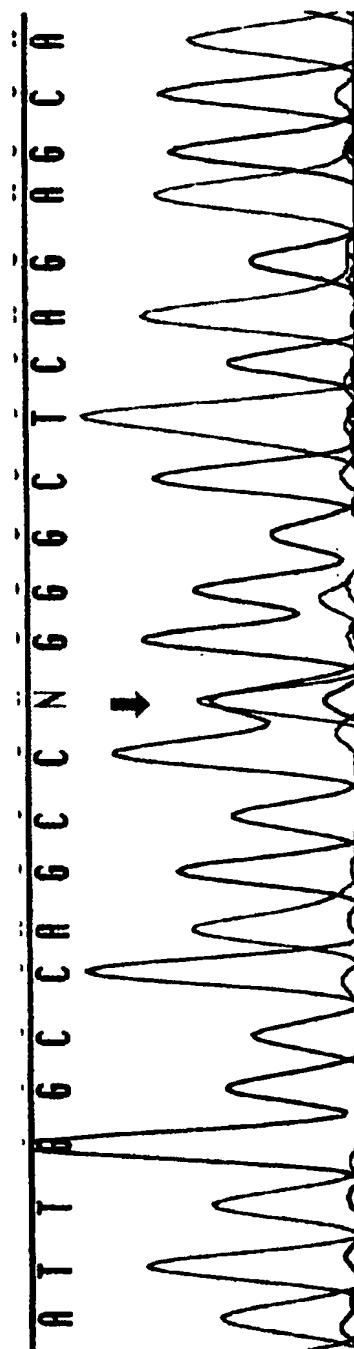
c) A604Vのアレルギー患者



第 7 図

358 360 364
 TrpProAlaArgAlaGlnSer
 Trp

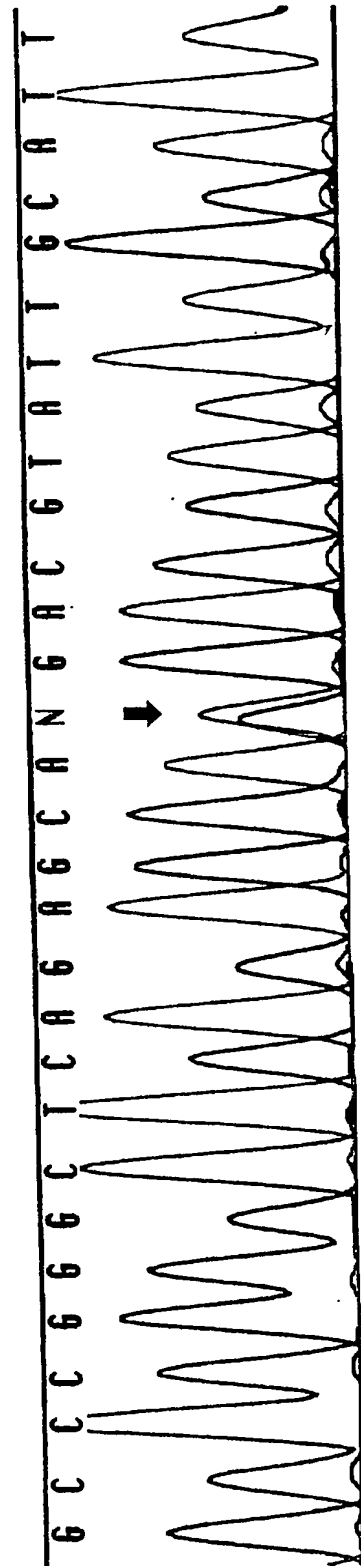
C
 5'-ATTGGCCAGCC/GGGCTCAGAGCA-3'
 T
 1070 1080 1090



360 AlaArgAlaGlnSer^{Met}ThrTyrCysIle
365 369

5' --GCCCGGGCTCAGAGCA/GACGTA TTGCA TT-3'

1080 1090 1100

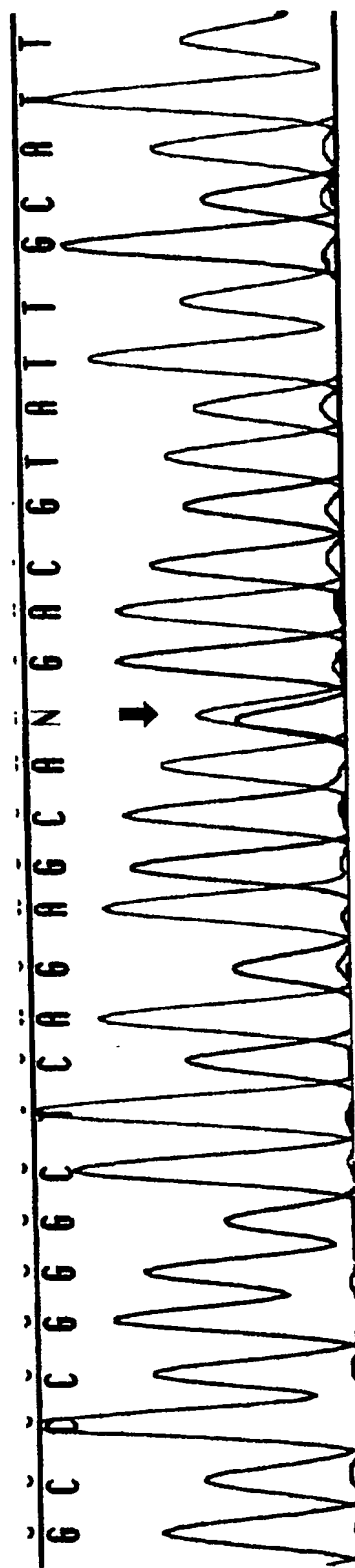


第 8 図

360 365 369
 AlaArgAlaGlnSer^{Met}_{Thr}ThrTyrCysIle

T
 5'-GCCCGGGCTCAGAGCA/GACGTATTGCATT-3'

C
 1080 1090 1100



第 9 図

375 378 380
 ProValGlyGlnAsp Gly GlyLeuAlaThrCys
 Arg

G
 5'-CCTGTGGGCCAGGAC / GGGGCC TTGCCACCTGC-3'
 C

1120 1130 1140

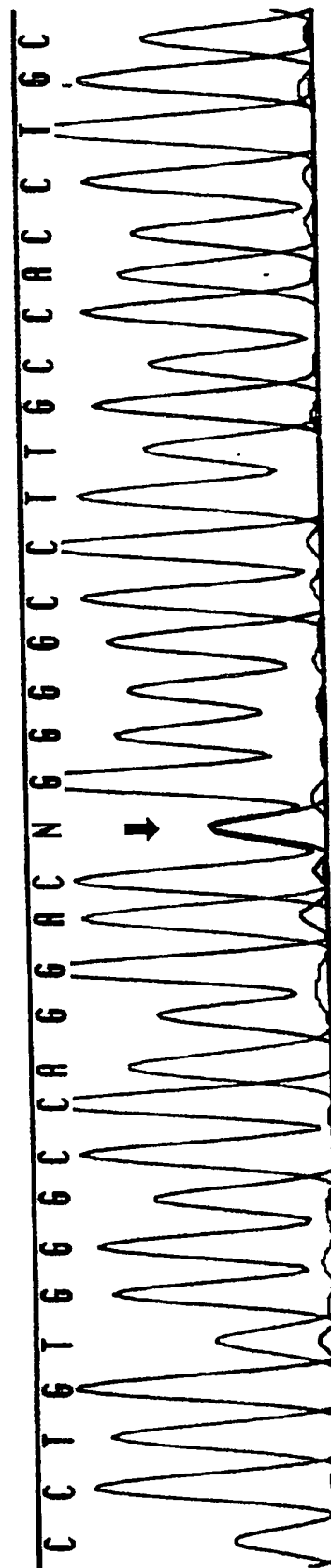


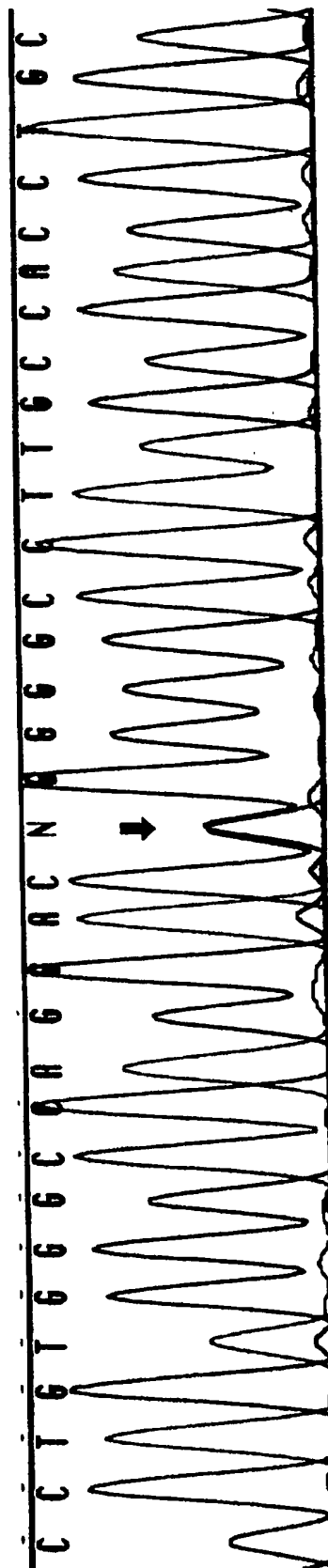
図 9 鋼

375 378 380
ProValGlyGlnAsp_{Arg}GlyGlyLeuAlaThrCys

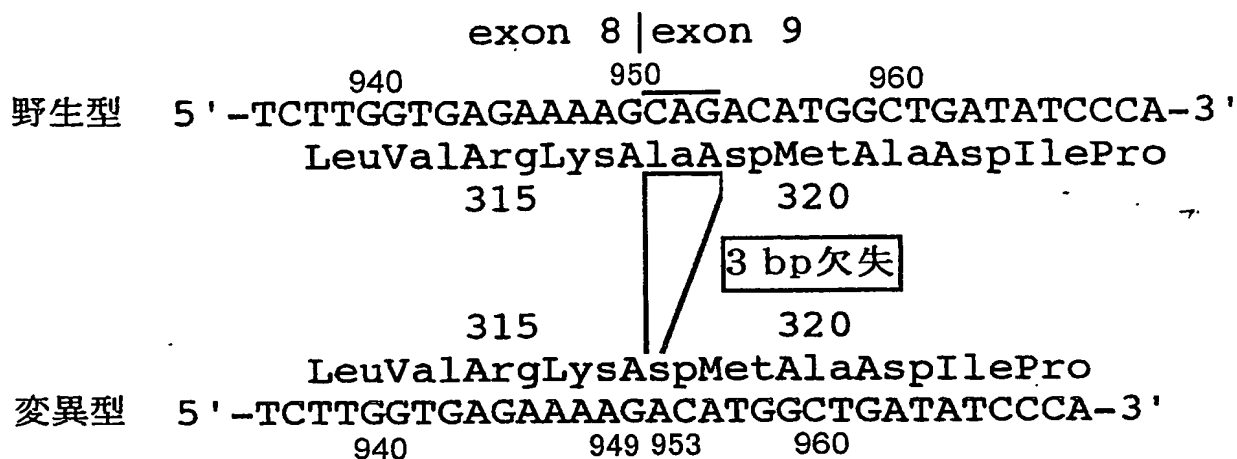
5' - CCTGTGGGCCAGGAC / GGGGCCTTGCCACCTGC - 3'

C

1120 1130 1140



第 10 図

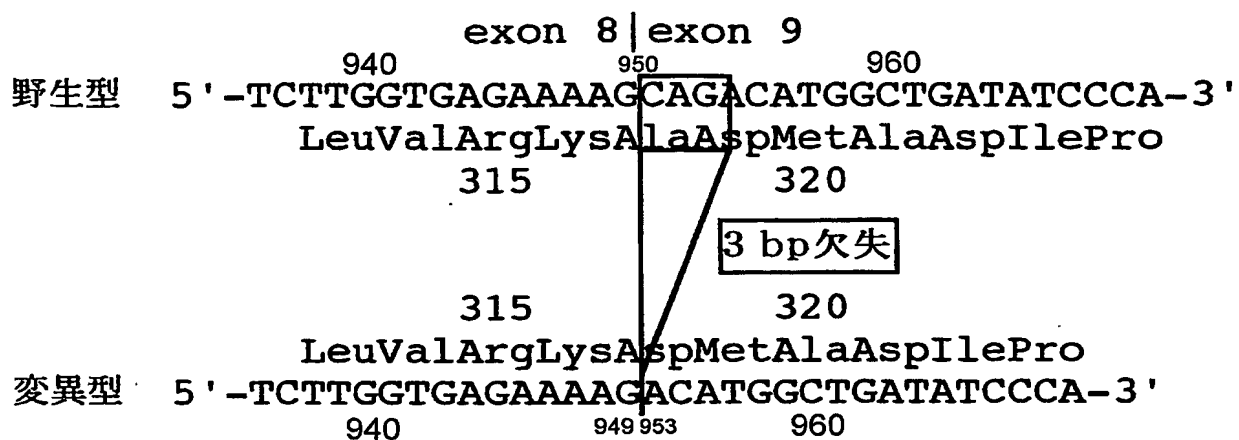


T C T T G G T G A G A A A G A C A T G G C T G A T A T C C C A

310 320 330



第 10 図



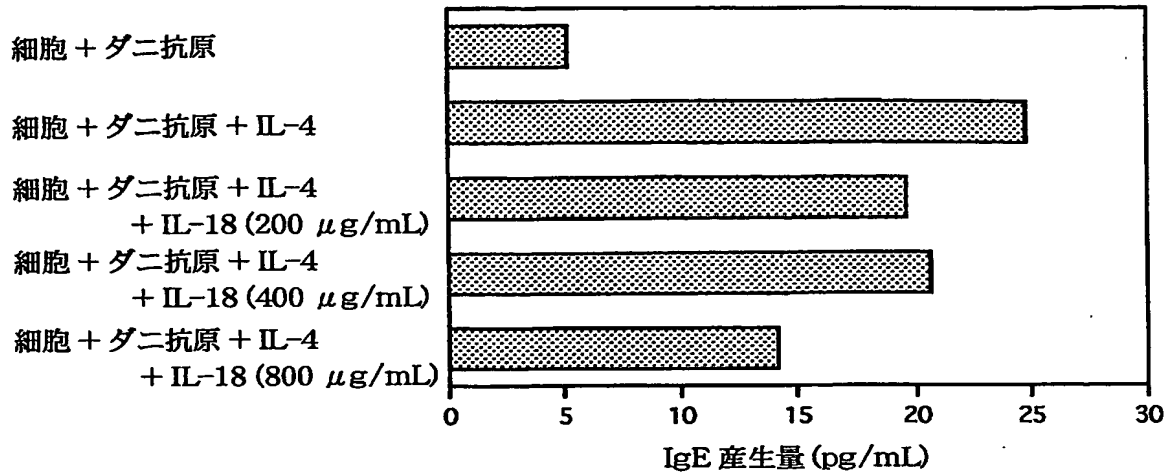
TTCTTGGTGAGAAAAGACATGGCTGATATCCCA

310 320 330

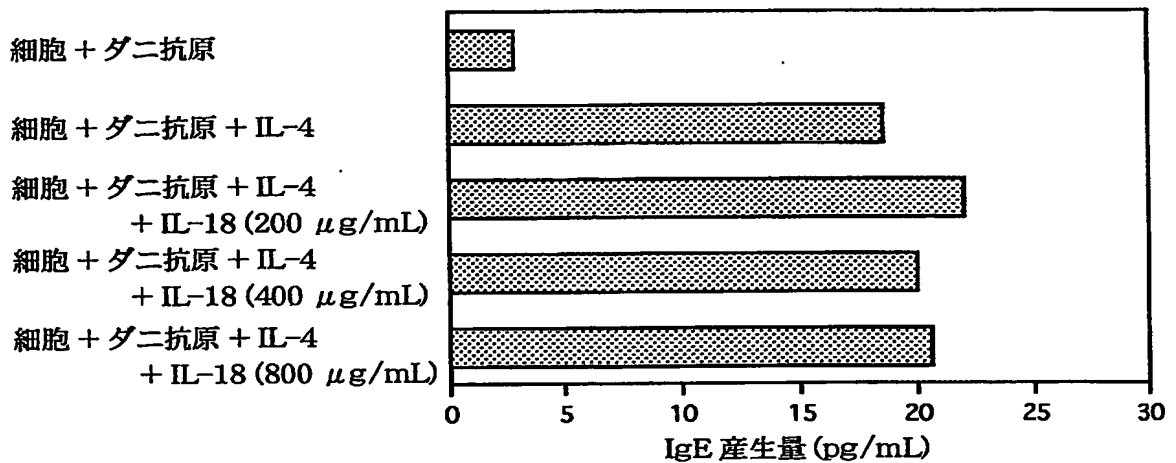


第 11 図

a) 非アレルギー者



b) 950del13のアレルギー患者

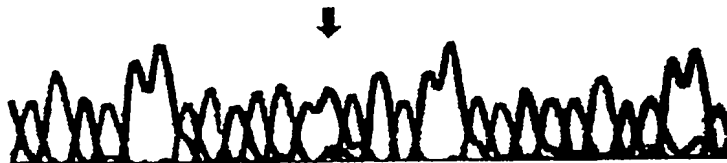


第 12 図

	1390	1400	1410
野生型	5'-CTAGTGGATCTACTTGTGGATGATAGCGGT-3'		
	LeuValAspLeu <u>Leu</u> ValAspAspSerGly		
	465	467	470
	LeuValAspLeu <u>Pro</u> ValAspAspSerGly		
変異型	5'-CTAGTGGATCTACCTGTGGATGATAGCGGT-3'		
	1390	1400	1410

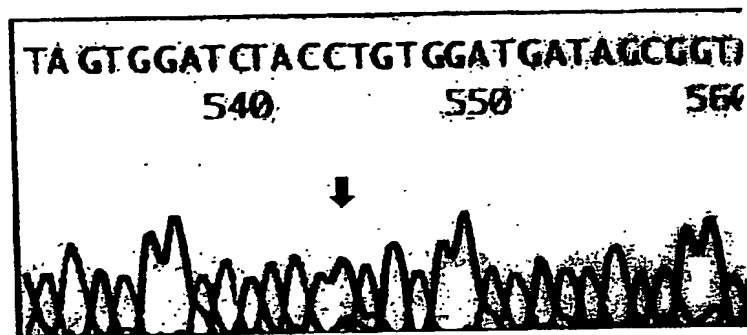
TA GTGGATCTACCTGTGGATGATAGCGGT

540 550 560

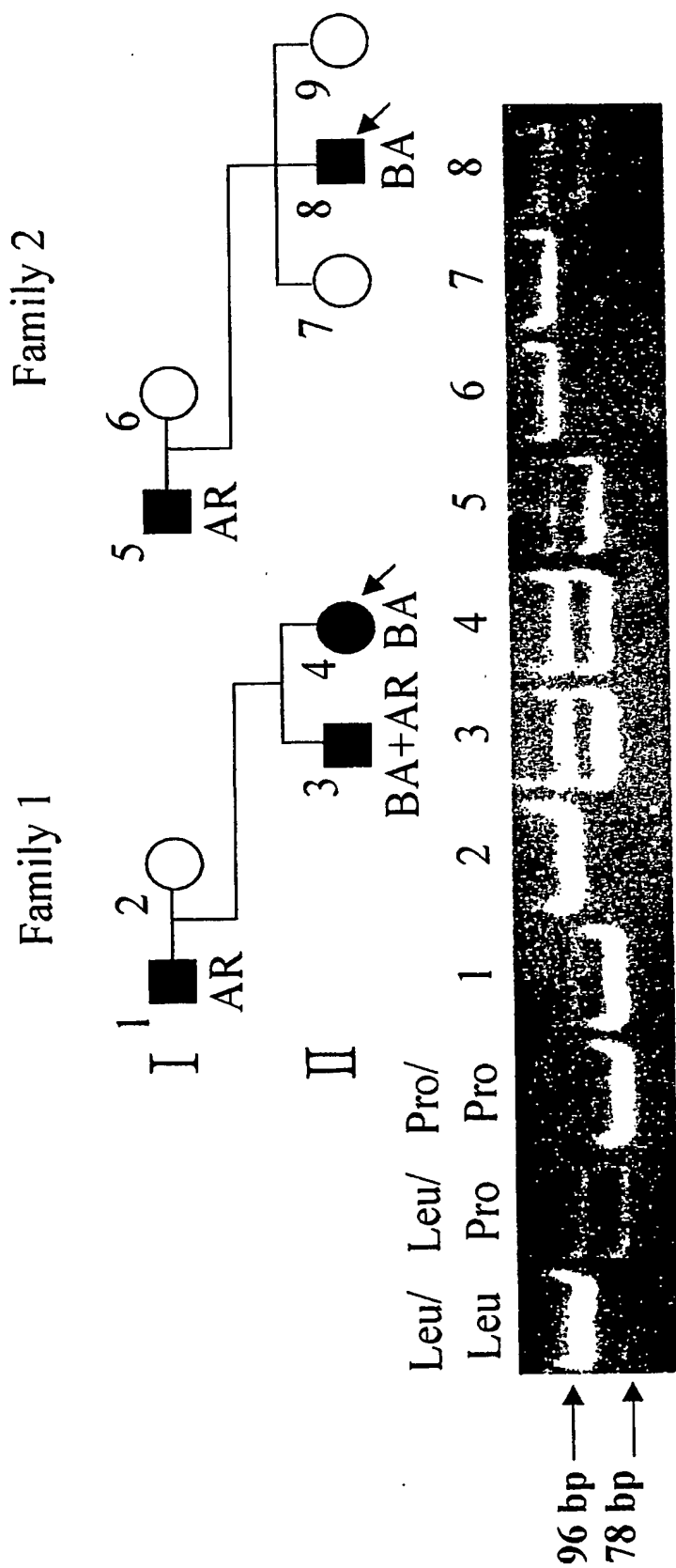


第 12 図

	1390	1400	1410
野生型	5' -CTAGTGGATCTACTTGTGGATGATAGCGGT-3'		
	LeuValAspLeu <u>Leu</u> ValAspAspSerGly		
	465	467	470
	LeuValAspLeu <u>Pro</u> ValAspAspSerGly		
変異型	5' -CTAGTGGATCTACCTGTGGATGATAGCGGT-3'		
	1390	1400	1410



第 13 図



SEQUENCE LISTING

<110> BML, INC.

KONDO, Naomi

<120> Method of Detecting Allergy

<130> PBM78/PCT

<140>

<141>

<150> JP P2002-252446

<151> 2002-8-30

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3400

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2589)

<400> 1

atg gca cat act ttt aga gga tgc tca ttg gca ttt atg ttt ata atc	48
Met Ala His Thr Phe Arg Gly Cys Ser Leu Ala Phe Met Phe Ile Ile	
1 5 10 15	

acg tgg ctg ttg att aaa gca aaa ata gat gcg tgc aag aga ggc gat	96
Thr Trp Leu Leu Ile Lys Ala Lys Ile Asp Ala Cys Lys Arg Gly Asp	
20 25 30	

gtg act gtg aag cct tcc cat gta att tta ctt gga tcc act gtc aat	144
Val Thr Val Lys Pro Ser His Val Ile Leu Leu Gly Ser Thr Val Asn	
35 40 45	

att aca tgc tct ttg aag ccc aga caa ggc tgc ttt cac tat tcc aga 192
 Ile Thr Cys Ser Leu Lys Pro Arg Gln Gly Cys Phe His Tyr Ser Arg
 50 55 60

cgt aac aag tta atc ctg tac aag ttt gac aga aga atc aat ttt cac 240
 Arg Asn Lys Leu Ile Leu Tyr Lys Phe Asp Arg Arg Ile Asn Phe His
 65 70 75 80

cat ggc cac tcc ctc aat tct caa gtc aca ggt ctt ccc ctt ggt aca 288
 His Gly His Ser Leu Asn Ser Gln Val Thr Gly Leu Pro Leu Gly Thr
 85 90 95

acc ttg ttt gtc tgc aaa ctg gcc tgt atc aat agt gat gaa att caa 336
 Thr Leu Phe Val Cys Lys Leu Ala Cys Ile Asn Ser Asp Glu Ile Gln
 100 105 110

ata tgt gga gca gag atc ttc gtt ggt gtt gct cca gaa cag cct caa 384
 Ile Cys Gly Ala Glu Ile Phe Val Gly Val Ala Pro Glu Gln Pro Gln
 115 120 125

aat tta tcc tgc ata cag aag gga gaa cag ggg act gtg gcc tgc acc 432
 Asn Leu Ser Cys Ile Gln Lys Gly Glu Gln Gly Thr Val Ala Cys Thr
 130 135 140

tgg gaa aga gga cga gac acc cac tta tac act gag tat act cta cag 480
 Trp Glu Arg Gly Arg Asp Thr His Leu Tyr Thr Glu Tyr Thr Leu Gln
 145 150 155 160

cta agt gga cca aaa aat tta acc tgg cag aag caa tgt aaa gac att 528
 Leu Ser Gly Pro Lys Asn Leu Thr Trp Gln Lys Gln Cys Lys Asp Ile
 165 170 175

tat tgt gac tat ttg gac ttt gga atc aac ctc acc cct gaa tca cct 576
 Tyr Cys Asp Tyr Leu Asp Phe Gly Ile Asn Leu Thr Pro Glu Ser Pro
 180 185 190

gaa tcc aat ttc aca gcc aag gtt act gct gtc aat agt ctt gga agc 624
 Glu Ser Asn Phe Thr Ala Lys Val Thr Ala Val Asn Ser Leu Gly Ser
 195 200 205

tcc tct tca ctt cca tcc aca ttc aca ttc ttg gac ata gtg agg cct	672
Ser Ser Ser Leu Pro Ser Thr Phe Thr Phe Leu Asp Ile Val Arg Pro	
210 215 220	
ctt cct ccg tgg gac att aga atc aaa ttt caa aag gct tcc gtg agc	720
Leu Pro Pro Trp Asp Ile Arg Ile Lys Phe Gln Lys Ala Ser Val Ser	
225 230 235 240	
aga tgt acc ctt tat tgg aga gat gag gga ctg gta ctg ctt aat cga	768
Arg Cys Thr Leu Tyr Trp Arg Asp Glu Gly Leu Val Leu Leu Asn Arg	
245 250 255	
ctc aga tat cgg ccc agt aac agc agg ctc tgg aat atg gtt aat gtt	816
Leu Arg Tyr Arg Pro Ser Asn Ser Arg Leu Trp Asn Met Val Asn Val	
260 265 270	
aca aag gcc aaa gga aga cat gat ttg ctg gat ctg aaa cca ttt aca	864
Thr Lys Ala Lys Gly Arg His Asp Leu Leu Asp Leu Lys Pro Phe Thr	
275 280 285	
gaa tat gaa ttt cag att tcc tct aag cta cat ctt tat aag gga agt	912
Glu Tyr Glu Phe Gln Ile Ser Ser Lys Leu His Leu Tyr Lys Gly Ser	
290 295 300	
tgg agt gat tgg agt gaa tca ttg aga gca caa aca cca gaa gaa gag	960
Trp Ser Asp Trp Ser Glu Ser Leu Arg Ala Gln Thr Pro Glu Glu Glu	
305 310 315 320	
cct act ggg atg tta gat gtc tgg tac atg aaa cgg cac att gac tac	1008
Pro Thr Gly Met Leu Asp Val Trp Tyr Met Lys Arg His Ile Asp Tyr	
325 330 335	
agt aga caa cag att tct ctt ttc tgg aag aat ctg agt gtc tca gag	1056
Ser Arg Gln Gln Ile Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu Ser Val Ser Glu	
340 345 350	
gca aga gga aaa att ctc cac tat cag gtg acc ttg cag gag ctg aca	1104
Ala Arg Gly Lys Ile Leu His Tyr Gln Val Thr Leu Gln Glu Leu Thr	
355 360 365	

gga ggg aaa gcc atg aca cag aac atc aca gga cac acc tcc tgg acc	1152
Gly Gly Lys Ala Met Thr Gln Asn Ile Thr Gly His Thr Ser Trp Thr	
370 375 380	
aca gtc att cct aga acc gga aat tgg gct gtg gct gtg tct gca gca	1200
Thr Val Ile Pro Arg Thr Gly Asn Trp Ala Val Ala Val Ser Ala Ala	
385 390 395 400	
aat tca aaa ggc agt tct ctg ccc act cgt att aac ata atg aac ctg	1248
Asn Ser Lys Gly Ser Ser Leu Pro Thr Arg Ile Asn Ile Met Asn Leu	
405 410 415	
tgt gag gca ggg ttg ctg gct cct cgc cag gtc tct gca aac tca gag	1296
Cys Glu Ala Gly Leu Leu Ala Pro Arg Gln Val Ser Ala Asn Ser Glu	
420 425 430	
ggc atg gac aac att ctg gtg act tgg cag cct ccc agg aaa gat ccc	1344
Gly Met Asp Asn Ile Leu Val Thr Trp Gln Pro Pro Arg Lys Asp Pro	
435 440 445	
tct gct gtt cag gag tac gtg gtg gaa tgg aga gag ctc cat cca ggg	1392
Ser Ala Val Gln Glu Tyr Val Val Glu Trp Arg Glu Leu His Pro Gly	
450 455 460	
ggt gac aca cag gtc cct cta aac tgg cta cgg agt cga ccc tac aat	1440
Gly Asp Thr Gln Val Pro Leu Asn Trp Leu Arg Ser Arg Pro Tyr Asn	
465 470 475 480	
gtg tct gct ctg att tca gag aac ata aaa tcc tac atc tgt tat gaa	1488
Val Ser Ala Leu Ile Ser Glu Asn Ile Lys Ser Tyr Ile Cys Tyr Glu	
485 490 495	
atc cgt gtg tat gca ctc tca ggg gat caa gga gga tgc agc tcc atc	1536
Ile Arg Val Tyr Ala Leu Ser Gly Asp Gln Gly Gly Cys Ser Ser Ile	
500 505 510	
ctg ggt aac tct aag cac aaa gca cca ctg agt ggc ccc cac att aat	1584
Leu Gly Asn Ser Lys His Lys Ala Pro Leu Ser Gly Pro His Ile Asn	
515 520 525	

gcc atc aca gag gaa aag ggg agc att tta att tca tgg aac agc att	1632
Ala Ile Thr Glu Glu Lys Gly Ser Ile Leu Ile Ser Trp Asn Ser Ile	
530 535 540	
cca gtc cag gag caa atg ggc tgc ctc ctc cat tat agg ata tac tgg	1680
Pro Val Gln Glu Gln Met Gly Cys Leu Leu His Tyr Arg Ile Tyr Trp	
545 550 555 560	
aag gaa cgg gac tcc aac tcc cag cct cag ctc tgt gaa att ccc tac	1728
Lys Glu Arg Asp Ser Asn Ser Gln Pro Gln Leu Cys Glu Ile Pro Tyr	
565 570 575	
aga gtc tcc caa aat tca cat cca ata aac agc ctg cag ccc cga gtg	1776
Arg Val Ser Gln Asn Ser His Pro Ile Asn Ser Leu Gln Pro Arg Val	
580 585 590	
aca tat gtc ctg tgg atg aca gct ctg aca gct gct ggt gaa agt tcc	1824
Thr Tyr Val Leu Trp Met Thr Ala Leu Thr Ala Ala Gly Glu Ser Ser	
595 600 605	
cac gga aat gag agg gaa ttt tgt ctg caa ggt aaa gcc aat tgg atg	1872
His Gly Asn Glu Arg Glu Phe Cys Leu Gln Gly Lys Ala Asn Trp Met	
610 615 620	
gcg ttt gtg gca cca agc att tgc att gct atc atc atg gtg ggc att	1920
Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys Ile Ala Ile Ile Met Val Gly Ile	
625 630 635 640	
ttc tca acg cat tac ttc cag caa aag gtg ttt gtt ctc cta gca gcc	1968
Phe Ser Thr His Tyr Phe Gln Gln Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala	
645 650 655	
ctc aga cct cag tgg tgt agc aga gaa att cca gat cca gca aat agc	2016
Leu Arg Pro Gln Trp Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Asn Ser	
660 665 670	
act tgc gct aag aaa tat ccc att gca gag gag aag aca cag ctg ccc	2064
Thr Cys Ala Lys Lys Tyr Pro Ile Ala Glu Glu Lys Thr Gln Leu Pro	
675 680 685	

ttg gac agg ctc ctg ata gac tgg ccc acg cct gaa gat cct gaa ccg	2112
Leu Asp Arg Leu Leu Ile Asp Trp Pro Thr Pro Glu Asp Pro Glu Pro	
690 695 700	
ctg gtc atc agt gaa gtc ctt cat caa gtg acc cca gtt ttc aga cat	2160
Leu Val Ile Ser Glu Val Leu His Gln Val Thr Pro Val Phe Arg His	
705 710 715 720	
ccc ccc tgc tcc aac tgg cca caa agg gaa aaa gga atc caa ggt cat	2208
Pro Pro Cys Ser Asn Trp Pro Gln Arg Glu Lys Gly Ile Gln Gly His	
725 730 735	
cag gcc tct gag aaa gac atg atg cac agt gcc tca agc cca cca cct	2256
Gln Ala Ser Glu Lys Asp Met Met His Ser Ala Ser Ser Pro Pro Pro	
740 745 750	
cca aga gct ctc caa gct gag agc aga caa ctg gtg gat ctg tac aag	2304
Pro Arg Ala Leu Gln Ala Glu Ser Arg Gln Leu Val Asp Leu Tyr Lys	
755 760 765	
gtg ctg gag agc agg ggc tcc gac cca aag cca gaa aac cca gcc tgt	2352
Val Leu Glu Ser Arg Gly Ser Asp Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Cys	
770 775 780	
ccc tgg acg gtg ctc cca gca ggt gac ctt ccc acc cat gat ggc tac	2400
Pro Trp Thr Val Leu Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr	
785 790 795 800	
tta ccc tcc aac ata gat gac ctc ccc tca cat gag gca cct ctc gct	2448
Leu Pro Ser Asn Ile Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala	
805 810 815	
gac tct ctg gaa gaa ctg gag cct cag cac atc tcc ctt tct gtt ttc	2496
Asp Ser Leu Glu Glu Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe	
820 825 830	
ccc tca agt tct ctt cac cca ctc acc ttc tcc tgt ggt gat aag ctg	2544
Pro Ser Ser Ser Leu His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu	
835 840 845	

act ctg gat cag tta aag atg agg tgt gac tcc ctc atg ctc tga 2589
 Thr Leu Asp Gln Leu Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu
 850 855 860

gtggtgaggc ttcaagcctt aaagtcagtg tgccctcaac cagcacagcc tgccccaatt 2649
 cccccagccc ctgctccagc agctgtcctc tctgggtgcc accatcggtc tggctgcagc 2709
 tagaggacag gcaagccagc tctgggggag tcttaggaac tgggagttgg tcttcactca 2769
 gatgcctcat cttgcctttc ccagggcctt aaaattacat ccttcactgt gtggacctag 2829
 agactccaac ttgaattcct agtaactttc ttggtatgct ggccagaaag ggaaatgagg 2889
 aggagagtag aaaccacagc tcttagtagt aatggcatac agtctagagg accattcatg 2949
 caatgactat ttctaaagca cctgctacac agcaggctgt acacagcaga tcagtactgt 3009
 tcaacagaac ttcctgagat gatggaaatg ttctacctct gcactcactg tccagtacat 3069
 tagacactag gcacattggc tgtaaatcac ttggaatgtg tttagcttga ctgaggaatt 3129
 aaattttgat tgtaaattta aatcgccaca catggctagt ggctactgta ttggagtgca 3189
 cagctctaga tggctcctag attattgaga gcctccaaaa caaatcaacc tagttctata 3249
 gatgaagaca taaaagacac tggtaaacac caatgtaaaa gggcccccaa ggtgggtcatg 3309
 actggtctca tttgcagaag tctaagaatg tacctttttc tggccgggcg tggtagctca 3369
 tgccctgtaat cccagcactt tgggaggctg a 3400

<210> 2
 <211> 2036
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1989)

<400> 2

atg gag ccg ctg gtg acc tgg gtg gtc ccc ctc ctc ttc ctc ttc ctg 48
Met Glu Pro Leu Val Thr Trp Val Val Pro Leu Leu Phe Leu Phe Leu
1 5 10 15

ctg tcc agg cag ggc gct gcc tgc aga acc agt gag tgc tgt ttt cag 96
Leu Ser Arg Gln Gly Ala Ala Cys Arg Thr Ser Glu Cys Cys Phe Gln
20 25 30

gac ccg cca tat ccg gat gca gac tca ggc tgc gcc tgc ggc cct agg 144
Asp Pro Pro Tyr Pro Asp Ala Asp Ser Gly Ser Ala Ser Gly Pro Arg
35 40 45

gac ctg aga tgc tat cgg ata tcc agt gat cgt tac gag tgc tcc tgg 192
Asp Leu Arg Cys Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Arg Tyr Glu Cys Ser Trp
50 55 60

cag tat gag ggt ccc aca gct ggg gtc agc cac ttc ctg cgg tgt tgc 240
Gln Tyr Glu Gly Pro Thr Ala Gly Val Ser His Phe Leu Arg Cys Cys
65 70 75 80

ctt agc tcc ggg cgc tgc tgc tac ttc gcc gcc ggc tca gcc acc agg 288
Leu Ser Ser Gly Arg Cys Cys Tyr Phe Ala Ala Gly Ser Ala Thr Arg
85 90 95

ctg cag ttc tcc gac cag gct ggg gtg tct gtg ctg tac act gtc aca 336
Leu Gln Phe Ser Asp Gln Ala Gly Val Ser Val Leu Tyr Thr Val Thr
100 105 110

ctc tgg gtg gaa tcc tgg gcc agg aac cag aca gag aag tct cct gag 384
Leu Trp Val Glu Ser Trp Ala Arg Asn Gln Thr Glu Lys Ser Pro Glu
115 120 125

gtg acc ctg cag ctc tac aac tca gtt aaa tat gag cct cct ctg gga 432
Val Thr Leu Gln Leu Tyr Asn Ser Val Lys Tyr Glu Pro Pro Leu Gly
130 135 140

gac atc aag gtg tcc aag ttg gcc ggg cag ctg cgt atg gag tgg gag 480
 Asp Ile Lys Val Ser Lys Leu Ala Gly Gln Leu Arg Met Glu Trp Glu
 145 150 155 160

acc ccg gat aac cag gtt ggt gct gag gtg cag ttc cgg cac cgg aca 528
 Thr Pro Asp Asn Gln Val Gly Ala Glu Val Gln Phe Arg His Arg Thr
 165 170 175

ccc agc agc cca tgg aag ttg ggc gac tgc gga cct cag gat gat gat 576
 Pro Ser Ser Pro Trp Lys Leu Gly Asp Cys Gly Pro Gln Asp Asp Asp
 180 185 190

act gag tcc tgc ctc tgc ccc ctg gag atg aat gtg gcc cag gaa ttc 624
 Thr Glu Ser Cys Leu Cys Pro Leu Glu Met Asn Val Ala Gln Glu Phe
 195 200 205

cag ctc cga cga cgg cag ctg ggg agc caa gga agt tcc tgg agc aag 672
 Gln Leu Arg Arg Arg Gln Leu Gly Ser Gln Gly Ser Ser Trp Ser Lys
 210 215 220

tgg agc agc ccc gtg tgc gtt ccc cct gaa aac ccc cca cag cct cag 720
 Trp Ser Ser Pro Val Cys Val Pro Pro Glu Asn Pro Pro Gln Pro Gln
 225 230 235 240

gtg aga ttc tcg gtg gag cag ctg ggc cag gat ggg agg agg cgg ctg 768
 Val Arg Phe Ser Val Glu Gln Leu Gly Gln Asp Gly Arg Arg Arg Leu
 245 250 255

acc ctg aaa gag cag cca acc cag ctg gag ctt cca gaa ggc tgt caa 816
 Thr Leu Lys Glu Gln Pro Thr Gln Leu Glu Leu Pro Glu Gly Cys Gln
 260 265 270

ggg ctg gcg cct ggc acg gag gtc act tac cga cta cag ctc cac atg 864
 Gly Leu Ala Pro Gly Thr Glu Val Thr Tyr Arg Leu Gln Leu His Met
 275 280 285

ctg tcc tgc ccg tgt aag gcc aag gcc acc agg acc ctg cac ctg ggg 912
 Leu Ser Cys Pro Cys Lys Ala Lys Ala Thr Arg Thr Leu His Leu Gly
 290 295 300

aac tat ggt gtt aag aat tca gaa tgg att gat gcc tgc atc aat att 240
 Asn Tyr Gly Val Lys Asn Ser Glu Trp Ile Asp Ala Cys Ile Asn Ile
 65 70 75 80

tct cat cat tat tgt aat att tct gat cat gtt ggt gat cca tca aat 288
 Ser His His Tyr Cys Asn Ile Ser Asp His Val Gly Asp Pro Ser Asn
 85 90 95

tct ctt tgg gtc aga gtt aaa gcc agg gtt gga caa aaa gaa tct gcc 336
 Ser Leu Trp Val Arg Val Lys Ala Arg Val Gly Gln Lys Glu Ser Ala
 100 105 110

tat gca aag tca gaa gaa ttt gct gta tgc cga gat gga aaa att gga 384
 Tyr Ala Lys Ser Glu Glu Phe Ala Val Cys Arg Asp Gly Lys Ile Gly
 115 120 125

cca cct aaa ctg gat atc aga aag gag gag aag caa atc atg att gac 432
 Pro Pro Lys Leu Asp Ile Arg Lys Glu Glu Lys Gln Ile Met Ile Asp
 130 135 140

ata ttt cac cct tca gtt ttt gta aat gga gac gag cag gaa gtc gat 480
 Ile Phe His Pro Ser Val Phe Val Asn Gly Asp Glu Gln Glu Val Asp
 145 150 155 160

tat gat ccc gaa act acc tgt tac att agg gtg tac aat gtg tat gtg 528
 Tyr Asp Pro Glu Thr Thr Cys Tyr Ile Arg Val Tyr Asn Val Tyr Val
 165 170 175

aga atg aac gga agt gag atc cag tat aaa ata ctc acg cag aag gaa 576
 Arg Met Asn Gly Ser Glu Ile Gln Tyr Lys Ile Leu Thr Gln Lys Glu
 180 185 190

gat gat tgt gac gag att cag tgc cag tta gcg att cca gta tcc tca 624
 Asp Asp Cys Asp Glu Ile Gln Cys Gln Leu Ala Ile Pro Val Ser Ser
 195 200 205

ctg aat tct cag tac tgt gtt tca gca gaa gga gtc tta cat gtg tgg 672
 Leu Asn Ser Gln Tyr Cys Val Ser Ala Glu Gly Val Leu His Val Trp
 210 215 220

aac cag tct gaa cct ggc agc atc gct tta aac tcg tat cac tcc aga 1200
 Asn Gln Ser Glu Pro Gly Ser Ile Ala Leu Asn Ser Tyr His Ser Arg
 385 390 395 400

aat tgt tct gag agt gat cac tcc aga aat ggt ttt gat act gat tcc 1248
 Asn Cys Ser Glu Ser Asp His Ser Arg Asn Gly Phe Asp Thr Asp Ser
 405 410 415

agc tgt ctg gaa tca cat agc tcc tta tct gac tca gaa ttt ccc cca 1296
 Ser Cys Leu Glu Ser His Ser Ser Leu Ser Asp Ser Glu Phe Pro Pro
 420 425 430

aat aat aaa ggt gaa ata aaa aca gaa gga caa gag ctc ata acc gta 1344
 Asn Asn Lys Gly Glu Ile Lys Thr Glu Gly Gln Glu Leu Ile Thr Val
 435 440 445

ata aaa gcc ccc acc tcc ttt ggt tat gat aaa cca cat gtg cta gtg 1392
 Ile Lys Ala Pro Thr Ser Phe Gly Tyr Asp Lys Pro His Val Leu Val
 450 455 460

gat cta ctt gtg gat gat agc ggt aaa gag tcc ttg att ggt tat aga 1440
 Asp Leu Leu Val Asp Asp Ser Gly Lys Glu Ser Leu Ile Gly Tyr Arg
 465 470 475 480

cca aca gaa gat tcc aaa gaa ttt tca tga gatcagctaa gttgcaccaa 1490
 Pro Thr Glu Asp Ser Lys Glu Phe Ser
 485 490

ctttgaagtc tgattttcct ggacagtttt ctgctttaat ttcattgaaaa gattatgatc 1550

tcagaaattg tatcttagtt ggtatcaacc aaatggagtg acttagtgta catgaaagcg 1610

taaagaggat gtgtggcatt ttcacttttg gcttgtaaag tacagacttt tttttttttt 1670

taaacaaaaa aagcattgta acttatgaac ctttacatcc agataggtta ccagtaacgg 1730

aacatatcca gtactcctgg ttcctagggtg agcagggtgat gccccaggga cctttgtagc 1790

cacttcactt tttttctttt ctctgccttg gtatagcata tgtgttttgt aagtttatgc 1850

atacagtaat ttttaagtaat ttcagaagaa attctcgaag cttttcaaaa ttggacttaa 1910
 aatctaattc aaactaatag aattaatgga atatgtaaat agaaacgtgt atatttttta 1970
 tgaaacatta cagttagaga tttttaaata aagaatttta aaactc 2016

<210> 4
 <211> 3498
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1626)

<400> 4
 atg aat tgt aga gaa tta ccc ttg acc ctt tgg gtg ctt ata tct gta 48
 Met Asn Cys Arg Glu Leu Pro Leu Thr Leu Trp Val Leu Ile Ser Val
 1 5 10 15
 agc act gca gaa tct tgt act tca cgt ccc cac att act gtg gtt gaa 96
 Ser Thr Ala Glu Ser Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu
 20 25 30
 ggg gaa cct ttc tat ctg aaa cat tgc tcg tgt tca ctt gca cat gag 144
 Gly Glu Pro Phe Tyr Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu
 35 40 45
 att gaa aca acc acc aaa agc tgg tac aaa agc agt gga tca cag gaa 192
 Ile Glu Thr Thr Thr Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu
 50 55 60
 cat gtg gag ctg aac cca agg agt tcc tcg aga att gct ttg cat gat 240
 His Val Glu Leu Asn Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp
 65 70 75 80
 tgt gtt ttg gag ttt tgg cca gtt gag ttg aat gac aca gga tct tac 288
 Cys Val Leu Glu Phe Trp Pro Val Glu Leu Asn Asp Thr Gly Ser Tyr

85

90

95

ttt ttc caa atg aaa aat tat act cag aaa tgg aaa tta aat gtc atc 336
 Phe Phe Gln Met Lys Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile
 100 105 110

aga aga aat aaa cac agc tgt ttc act gaa aga caa gta act agt aaa 384
 Arg Arg Asn Lys His Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys
 115 120 125

att gtg gaa gtt aaa aaa ttt ttt cag ata acc tgt gaa aac agt tac 432
 Ile Val Glu Val Lys Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr
 130 135 140

tat caa aca ctg gtc aac agc aca tca ttg tat aag aac tgt aaa aag 480
 Tyr Gln Thr Leu Val Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys
 145 150 155 160

cta cta ctg gag aac aat aaa aac cca acg ata aag aag aac gcc gag 528
 Leu Leu Leu Glu Asn Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu
 165 170 175

ttt gaa gat cag ggg tat tac tcc tgc gtg cat ttc ctt cat cat aat 576
 Phe Glu Asp Gln Gly Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn
 180 185 190

gga aaa cta ttt aat atc acc aaa acc ttc aat ata aca ata gtg gaa 624
 Gly Lys Leu Phe Asn Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu
 195 200 205

gat cgc agt aat ata gtt ccg gtt ctt ctt gga cca aag ctt aac cat 672
 Asp Arg Ser Asn Ile Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His
 210 215 220

gtt gca gtg gaa tta gga aaa aac gta agg ctc aac tgc tct gct ttg 720
 Val Ala Val Glu Leu Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu
 225 230 235 240

ctg aat gaa gag gat gta att tat tgg atg ttc ggg gaa gaa aat gga 768
 Leu Asn Glu Glu Asp Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly

245	250	255	
tcg gat cct aat ata cat gaa gag aaa gaa atg aga att atg act cca			816
Ser Asp Pro Asn Ile His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro			
260	265	270	
gaa ggc aaa tgg cat gct tca aaa gta ttg aga att gaa aat att ggt			864
Glu Gly Lys Trp His Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly			
275	280	285	
gaa agc aat cta aat gtt tta tat aat tgc act gtg gcc agc acg gga			912
Glu Ser Asn Leu Asn Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly			
290	295	300	
ggc aca gac acc aaa agc ttc atc ttg gtg aga aaa gca gac atg gct			960
Gly Thr Asp Thr Lys Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp Met Ala			
305	310	315	320
gat atc cca ggc cac gtc ttc aca aga gga atg atc ata gct gtt ttg			1008
Asp Ile Pro Gly His Val Phe Thr Arg Gly Met Ile Ile Ala Val Leu			
325	330	335	
atc ttg gtg gca gta gtg tgc cta gtg act gtg tgt gtc att tat aga			1056
Ile Leu Val Ala Val Val Cys Leu Val Thr Val Cys Val Ile Tyr Arg			
340	345	350	
gtt gac ttg gtt cta ttt tat aga cat tta acg aga aga gat gaa aca			1104
Val Asp Leu Val Leu Phe Tyr Arg His Leu Thr Arg Arg Asp Glu Thr			
355	360	365	
tta aca gat gga aaa aca tat gat gct ttt gtg tct tac cta aaa gaa			1152
Leu Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Leu Lys Glu			
370	375	380	
tgc cga cct gaa aat gga gag gag cac acc ttt gct gtg gag att ttg			1200
Cys Arg Pro Glu Asn Gly Glu Glu His Thr Phe Ala Val Glu Ile Leu			
385	390	395	400
ccc agg gtg ttg gag aaa cat ttt ggg tat aag tta tgc ata ttt gaa			1248
Pro Arg Val Leu Glu Lys His Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Glu			

405	410	415	
agg gat gta gtg cct gga gga gct gtt gtt gat gaa atc cac tca ctg			1296
Arg Asp Val Val Pro Gly Gly Ala Val Val Asp Glu Ile His Ser Leu			
420	425	430	
ata gag aaa agc cga aga cta atc att gtc cta agt aaa agt tat atg			1344
Ile Glu Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Val Leu Ser Lys Ser Tyr Met			
435	440	445	
tct aat gag gtc agg tat gaa ctt gaa agt gga ctc cat gaa gca ttg			1392
Ser Asn Glu Val Arg Tyr Glu Leu Glu Ser Gly Leu His Glu Ala Leu			
450	455	460	
gtg gaa aga aaa att aaa ata atc tta att gaa ttt aca cct gtt act			1440
Val Glu Arg Lys Ile Lys Ile Ile Leu Ile Glu Phe Thr Pro Val Thr			
465	470	475	480
gac ttc aca ttc ttg ccc caa tca cta aag ctt ttg aaa tct cac aga			1488
Asp Phe Thr Phe Leu Pro Gln Ser Leu Lys Leu Leu Lys Ser His Arg			
485	490	495	
gtt ctg aag tgg aag gcc gat aaa tct ctt tct tat aac tca agg ttc			1536
Val Leu Lys Trp Lys Ala Asp Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Arg Phe			
500	505	510	
tgg aag aac ctt ctt tac tta atg cct gca aaa aca gtc aag cca ggt			1584
Trp Lys Asn Leu Leu Tyr Leu Met Pro Ala Lys Thr Val Lys Pro Gly			
515	520	525	
aga gac gaa ccg gaa gtc ttg cct gtt ctt tcc gag tct taa			1626
Arg Asp Glu Pro Glu Val Leu Pro Val Leu Ser Glu Ser			
530	535	540	
tcttcagaaa cagtgaacgc caaaaagaac tcaagatatt ctggggactg agcatatgaa			1686
cctgttcata acaaaggctg tgactcgaaa taattaactt tgtcaaaatc ctgctcacia			1746
tttgaagatg aaacttgtca ttaggttggc gggaatgaga ctaaagattg cgctgtgggc			1806

tgtggtcagc tgctcccaga agacctggaa ttcaaaagaa atggagctat tctttttctc 1866
cctctttcat aactggatgc agctgctcat actcaatccc atattcagca agtgtgaagc 1926
tggacgtgat gcaaaataac cgatgcccta caaaaagggc gcatctttaa gagttttaat 1986
gccagtgcct aattcgaatg aggggatttt aagtgtctga agaggcattt tctagggacc 2046
agtgggtgac tgagtaactg aaatgctgct ttcactccct aacaccatgg atctggttgt 2106
gcataggatg tgggaggagg ggctggcagg gccgccttca gaggctgcag ggcctcagcc 2166
tcaggatgca tttaatgtat cctggccaca gttgcagcca acggttcttg aaagctcggt 2226
aaggccctgc aacgcagagc ctgcttatgt ggatctatct atgggaactt cttaaaagga 2286
ccccagaata gctctttatc tttcacaaga gacacaaatt ctaattgagt taattatctg 2346
ggcctttcac tttggatgct ctgaaacatt tgttgatttt gtgtgaatgt ttatatcaaa 2406
atgtttgccg ggttgtatta gccattgaat agcaaaaaac tgatagttac ttgcttgttt 2466
tttaaaaatt acatattaaa aatgcccttg gcataaggca gcatgggtgtg gcagttaaga 2526
gatgggctgt gcagcccatc ctgagctcca gtcctgagtt tgctacttac ttctgtggcc 2586
tctggaacct tatccaacct cttgggtgctt cagtttcctc atctgtgaaa ttagaattta 2646
taataattgc acctacctcc caggggtaac taaatgaata aatataataa agtacttaca 2706
gtggttcctg acacagactc agcactccgt cagtgttgcc atgactatct ttattatcat 2766
tattaatgat tacttagatc aattatttag cagtggacta atggaagcta cagagcaggg 2826
aagggaagca gatctaggga ggaaggcagt tttgatttga ggaggtttgc acatgtagag 2886
aagcactatg gagaagcata tccagagggc gaaagatatc tctccattgt gcatctgcct 2946
cttttgacgt tggaagacac atgtcttact ccccaaaggg agcccagcac tgggagcctt 3006

cttgatgatk tcaaaaataa tagctattca agaaaatcac caagtgactg tgaaaccgtc 3066
 agttcggaag gctggttaga acatgtggga gcaacatgaa tgttctacaa aagttttaaag 3126
 cagagattgt ttcaaatggg ttagtagat attactgaaa accaaaaaag agtgagattg 3186
 tcagtgtgaa aatgtgattt aatgtttgta gtgcttataa ttttgtgtac caactggatg 3246
 actaaaaaga gtaaaataac ttaattaata gctcatattt tatgtgtgaa aacatgttag 3306
 tgaacatata taatcaaaat agatttcatt gctattgcat agtctctaata acatagaatg 3366
 attttgcttt tctcttttat tatacttgct ttaaaatact tgaaatatat tttgcattaa 3426
 atgcatttca agttaaatgt cttaaataga tacattagat gtgtgtttta aaatgcataa 3486
 aacacgttga aa 3498

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 ctccctgaac caatttggtc 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 ctgcacttcg atgctgaagc 20

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cggagttcta taccagagtt g

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

acatctaaca tcccagtagg c

21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gatgacagct ctgacagctg

20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ggcctgatga ccttggatt

19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ctgctctgct ttgctgaatg

20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
tcctcttgtg aagacgtggc 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
cgtcatacca gccattttcc 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
ttggtgcaac ttagctgatc 20